

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Orthopädie

Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die
Proliferation und Differenzierung mesenchymaler
Progenitorzellen

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Oliver Marvin Kemper
aus Meschede
2016

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer |
| 1. Gutachter: | Univ.-Prof. Dr. med. M. Jäger |
| 2. Gutachter: | Priv.-Doz. Dr. Bernd Giebel |

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2017

Publikationen:

Kemper O, Herten M, Fischer J, Haversath M, Beck S, Classen T, Warwas S, Tassemeier T, Landgraeber S, Lensing-Höhn S, Krauspe R, Jäger M*

Prostacyclin suppresses Twist expression in the presence of indomethacin in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells

Med Sci Monit. 2014 Nov 10;20:2219-27. doi: 10.12659/MSM.890953.

Herten M; Kemper O; Krauspe R; Jäger M

Indomethazin und Prostazyklin: Antagonisten bei der osteoblastären Differenzierung?

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2009 in Berlin

Poster: Knochenregeneration

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Überblick..... | 7 |
| 1.2 | Mesenchymale Stromazellen | 8 |
| 1.2.1 | Die mesenchymale Stromazelle als zugrunde liegendes Zellsystem..... | 8 |
| 1.2.2 | Charakteristika einer MSC | 9 |
| 1.2.3 | Isolation und Expansion | 11 |
| 1.2.4 | Differenzierung von MSCs in Richtung der osteoblastären Zellreihe..... | 11 |
| 1.2.5 | Differenzierung von MSCs in Richtung der adipogenen Zelllinie | 17 |
| 1.2.6 | Verwendungsmöglichkeiten..... | 17 |
| 1.3 | Verwendete Moleküle | 18 |
| 1.3.1 | Indomethacin..... | 18 |
| 1.3.1.1 | Wirkungen von Indomethacin | 18 |
| 1.3.2 | Iloprost | 20 |
| 1.3.2.1 | Wirkungen von Iloprost..... | 20 |
| 1.4 | Ziel der vorliegenden Arbeit | 22 |
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Versuchsaufbau | 23 |
| 2.2 | Knochenmarkspender..... | 24 |
| 2.3 | Methoden | 25 |
| 2.3.1 | Gewinnung und Aufarbeitung von Knochenmarkstromazellen | 25 |
| 2.3.2 | Expansion der MNCs | 26 |
| 2.3.3 | Bestimmung des mesenchymalen Charakters | 28 |
| 2.3.3.1 | Aufbereitung der MNCs | 28 |
| 2.3.3.2 | Prinzip der Durchflusszytometrie | 28 |
| 2.3.3.3 | Untersuchte Oberflächenantigene..... | 29 |
| 2.3.4 | Herstellung des Kulturmediums | 29 |
| 2.3.4.1 | Herstellung der Indomethacin-Stocklösung..... | 31 |
| 2.3.4.2 | Berechnung der Indomethacin-Konzentration | 31 |
| 2.3.4.3 | Herstellung der Iloprost-Stocklösung | 32 |
| 2.3.4.4 | Berechnung der Iloprost-Konzentration | 32 |
| 2.4 | Versuchsansatz | 32 |
| 2.5 | Versuchsende..... | 33 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| 2.6 | Zellproliferation | 33 |
| 2.7 | Zelldifferenzierung..... | 34 |
| 2.7.1 | ALP-Assay | 34 |
| 2.7.2 | BCA-Assay..... | 36 |
| 2.7.3 | Immunzytochemische Nachweisverfahren..... | 36 |
| 2.7.3.1 | Untersuchte Marker | 36 |
| 2.7.3.2 | Durchführung | 37 |
| 2.8 | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) | 38 |
| 2.8.1 | Ribonukleinsäure-Isolation | 38 |
| 2.8.2 | Reverse Transkription | 39 |
| 2.8.3 | Polymerase-Kettenreaktion | 40 |
| 2.9 | Statistische Auswertung..... | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Durchflusszytometrische Analyse..... | 42 |
| 3.2 | Proliferationsverhalten von MSCs ohne Medikamentenapplikation | 43 |
| 3.3 | Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Proliferation von MSCs..... | 44 |
| 3.4 | Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Differenzierung von MSCs. | 54 |
| 3.4.1 | Ergebnisse der immunzytochemischen Analyse | 54 |
| 3.5 | Ergebnisse der RT-PCR | 59 |
| 3.6 | Ergebnisse von BCA- und ALP-Assay zur Bestimmung der spezifischen ALP- | |
| Aktivität | 63 | |
| 3.6.1 | BCA-Assay | 63 |
| 3.6.2 | Spezifische ALP-Aktivität | 66 |
| 3.6.3 | Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die spezifische ALP-Aktivität | 67 |
| 4 | Diskussion | 77 |
| 4.1 | Proliferationsverhalten der MSCs unter Kulturbedingungen..... | 77 |
| 4.2 | Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Proliferation von MSCs | 78 |
| 4.3 | Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Differenzierung von MSCs | 80 |
| 4.3.1 | Ergebniszusammenfassung | 80 |
| 4.3.2 | Osteosuppressive Effekte von Indomethacin | 82 |
| 4.3.3 | Wirkung von PGE ₂ auf den Knochenstoffwechsel | 83 |
| 4.3.4 | Wirkung von PGI ₂ auf den Knochenstoffwechsel..... | 84 |

| | | |
|------------|---|-------------------|
| 4.3.5 | Suppression von Twist unter einer Kombination von Indomethacin und Iloprost | 85 |
| 4.3.6 | Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die ALP-Expression und -Aktivität | 86 |
| 4.3.7 | Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Expression von OC, Col1 und Runx2 | 87 |
| 4.4 | Fazit..... | 87 |
| 4.5 | Einschränkungen der Studie..... | 88 |
| 4.6 | Klinischer Ausblick..... | 89 |
| 5 | <i>Schlussfolgerungen.....</i> | <i>91</i> |
| 6 | <i>Zusammenfassung</i> | <i>92</i> |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | <i>93</i> |
| 8 | <i>Anhang</i> | <i>116</i> |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis..... | 116 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis..... | 119 |
| | Tabellenverzeichnis | 122 |
| 8.3 | Chemikalien..... | 125 |
| 8.3.1 | Verwendete <i>Primer</i> | 126 |
| 8.3.2 | Assay-Kits..... | 126 |
| 8.4 | Biochemikalien: | 126 |
| 8.4.1 | Immunzytochemische Marker..... | 126 |
| 8.4.2 | Antikörper | 127 |
| 8.4.3 | Enzyme: | 127 |
| 8.5 | Verbrauchsmittel und Geräte | 127 |
| 8.6 | Verwendete Computerprogramme..... | 128 |
| 9 | <i>Danksagung.....</i> | <i>129</i> |
| 10 | <i>Lebenslauf</i> | <i>130</i> |

1 Einleitung

1.1 Überblick

„Multipotente mesenchymale Stromazellen“ (MSCs) sind plastikadhärente fibroblastoide Zellen mit adipogenem, osteogenem und kartilagenem Differenzierungspotential. Sie exprimieren die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 und lassen sich aus Knochenmark, Nabelschnurblut, Fettgewebe, peripherem Blut und Bindegewebe isolieren (Dominici *et al*, 2006; Horwitz *et al*, 2002). Auf dem Gebiet der regenerativen Orthopädie könnten Patienten mit großen Knochendefekten oder knöcherner Wundheilungsstörung von einer Therapie mit MSCs aus Knochenmark profitieren (Jäger *et al*, 2011a). Bereits bekannt ist, dass eine Differenzierung von MSCs in Richtung der osteoblastären Zelllinie durch Dexamethason und β -Glycerophosphat gefördert wird, wohingegen Indomethacin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin eine Differenzierung zu Adipozyten induzieren (Brüedigam *et al*, 2011). Wnt-Signalproteine aus der *transforming growth factor beta* (TGF- β) Familie sowie Hormone wie beispielsweise 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃, fördern die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren wie *Runx-related transcription factor 2* (Runx2), welcher essentiell für die osteoblastäre Differenzierung ist (Lee *et al*, 2000). Im Gegensatz dazu inhibiert *Twist-related protein 1* (Twist) die Funktion von Runx2 und wirkt so der Expression von osteoblastenspezifischen Markern entgegen (Bialek *et al*, 2004).

Indomethacin, ein gebräuchliches Analgetikum aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) oder *non-steroid anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), ist ein Cyclooxygenase-(COX)-Inhibitor, der häufig in der Therapie von Osteoarthritis und osteonekrose-assoziierten Schmerzen sowie zur Prophylaxe für Heterotopen Ossifikation (HO) nach größeren muskuloskelettalchirurgischen Eingriffen eingesetzt wird (Moed and Maxey, 1993). Als nicht-selektiver Inhibitor der COX1 und COX2 unterdrückt es die Produktion von Prostaglandin H₂, einem Vorläufermolekül in der Synthese von Prostaglandin I₂ (PGI₂ = Prostazyklin) und Prostaglandin E₂ (PGE₂). Der suppressive Effekt auf Osteoblasten konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Brüedigam *et al*, 2011; Persson *et al*, 2005).

Iloprost, ein stabiles Prostazyklinanalogon, wird zur Behandlung von *Thrombangiitis obliterans*, Pulmonaler Hypertension und Sklerodermie wegen seiner antithrombotischen, vasodilatativen und antiproliferativen Effekte eingesetzt (Schermyly *et al*, 2004).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass es Schmerzen aufgrund von Knochenmarködem (BME) und früher avaskulärer Osteonekrose (AVN) reduziert (Jäger *et al*, 2011b). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob NSAIDs, welche die Prostazyklinsynthese unterdrücken und die osteoblastäre Differenzierung hemmen, sinnvoll in der Behandlung von AVN-assoziierten Schmerzen sind.

Das Ziel dieser *in vitro*-Studie ist es den Effekt von Indomethacin, Iloprost und einer Kombination beider Medikamente auf humanen MSCs aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*, BMSCs) im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung in Richtung der osteoblastären Zelllinie zu untersuchen.

1.2 Mesenchymale Stromazellen

1.2.1 Die mesenchymale Stromazelle als zugrundeliegendes Zellsystem

In dieser Arbeit wurden humane adulte MSCs als zugrunde liegendes Zellsystem ausgewählt, da diese multipotenten Zellen aufgrund ihres hohen Differenzierungspotenzials einen vielversprechenden Ansatz auf dem Gebiet der regenerativen Orthopädie darstellen (Bernardo *et al*, 2012). Ein Einsatz als autologe oder auch allogene Zelltherapie bei Patienten mit größeren muskuloskelettalen Defekten ist denkbar (Griffin *et al*, 2011). Zudem lassen sie sich aus humanem Knochenmark isolieren und unter Kulturbedingungen in ausreichender Zahl expandieren (Pittenger *et al*, 1999).

MSCs sind adulte, selbsterneuernde, multipotente Progenitorzellen mesodermalen Ursprungs, die in unterschiedliche mesenchymale Gewebe differenzieren können (Malgieri *et al*, 2010). Adulte MSCs besitzen das Potenzial sich in die Zelltypen des Stütz- und Bewegungsapparates zu differenzieren wie Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe sowie Sehnen und Knochenmarkstroma (Pittenger *et al*, 1999). MSCs können aus Knochenmark, aber auch aus anderen Geweben, wie zum Beispiel aus Fettgewebe (Im *et al*, 2005), Plazenta (In 't Anker *et al*, 2004), Nabelschnurblut (Kögler *et al*, 2004), peripherem Blut (Horwitz *et al*, 2002) oder Zahnmark (Barry und Murphy, 2004) gewonnen werden.

Sie waren bereits die Grundlage vieler *in vivo*- und *in vitro*-Studien auf dem Gebiet der regenerativen Medizin (Bernardo *et al*, 2012; Wegmeyer *et al*, 2013). Jäger *et al* verwendeten 2011 konzentriertes Knochenmarkaspirat in der Therapie von 39 Patienten mit volumetrischen Knochendefekten. Durchflusszytometrisch wurde der mesenchymale Charakter des Knochenmarkaspirats bestätigt. Im Vergleich zu nichtkonzentriertem Knochenmarkaspirat bildeten die Zellen des konzentrierten Knochenmarkaspirats frühzeitiger und größere *colony forming units fibroblast* (CFU-F), was auf einen höheren Anteil mesenchymaler Zellen zurückgeführt wurde. Alle Knochendefekte kamen innerhalb des Untersuchungszeitraums von 6 Monaten zur Abheilung, ohne dass ein *autograft* verwendet wurde. Es wird daher angenommen, dass Patienten mit großen Knochendefekten oder knöcherner Wundheilungsstörung von einer Therapie mit MSCs aus Knochenmark profitieren könnten (Jäger *et al*, 2011a).

Sowohl autologe als auch allogene MSCs wurden *in vivo* auf ihr Potential Knochen- oder Knorpelgewebe zu bilden getestet (Griffin *et al*, 2011). Bislang gibt es noch keine von der *Food and Drug Administration* zugelassene Indikation für eine Therapie mit MSCs (Daley, 2012).

1.2.2 Charakteristika einer MSC

Mikroskopisch sind MSCs aus humanem Knochenmark als fibroblastenartige, auf Plastik adhärente Zellen, die nach 5-7 Tagen sichtbare symmetrische Kolonien bilden (Pittenger *et al*, 1999). Entsprechend dieser Morphologie und des Wachstumsmusters wurden diese Zellpopulationen erstmals durch Friedenstein als *colony-forming units fibroblast* (CFU-F) benannt (Friedenstein *et al*, 1970, 1974, 1976; Owen und Friedenstein, 1988).

MSCs können aus der Fraktion mononukleärer Zellen (MNC) angezogen werden. Wenn ein Gemisch aus mononukleären Zellen in Kulturbedältern aus Plastik kultiviert wird, lassen sich die nicht-adhärenenten Zellen, wie die hämatopoetischen Zellen, beim Mediumwechsel entfernen. MSCs bleiben adhärent (Aubin, 1998; Caplan, 1991). Zur Unterscheidung dieser verbliebenen Zellen erfolgt eine Immunophänotypisierung anhand zellspezifischer Oberflächenproteine, sogenannten Oberflächenmarkern, um eine genauere Beschreibung und Eingrenzung mononukleärer Zellen zu ermöglichen. Sie exprimieren die Marker CD73, CD90 und CD105. Nicht exprimiert werden definitionsgemäß CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR (Dominici *et al*, 2006).

Aufgrund des therapeutischen Potenzials von humanen MSCs und dem damit verbundenen steigenden Interesse biomedizinischer Fachrichtungen, wurde es notwendig einheitliche Kriterien zur Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen zu definieren, damit Studienergebnisse miteinander verglichen werden konnten (Dominici *et al*, 2006). Daher definierte das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* folgende drei Minimalkriterien, die eine Zelle erfüllen muss, um als mesenchymale Stromazelle bezeichnet werden zu können:

1. Die MSC muss unter standardisierten Kulturbedingungen adhärent auf Plastikoberflächen sein.
2. Die MSC muss auf ihrer Oberfläche die Antigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren und darf folgende Oberflächenmoleküle nicht ausbilden: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR (CD105+CD73+CD90+CD45-CD34-CD79alpha/CD19-HLA-DR-)
3. MSCs müssen sich *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren können (Dominici *et al*, 2006).

Bei MSCs handelt es sich allem Anschein nach nicht, wie ursprünglich angenommen (Jiang *et al*, 2002; Pereira *et al*, 1995; Pittenger *et al*, 1999), um eine homogene Zellpopulation. Durch die o.g. Identifizierung diverser MSC-Oberflächenmarker stellte sich heraus, dass isolierte MSCs, abhängig vom Ursprungsgewebe, sehr heterogen bezüglich ihres Phänotyps und ihres Differenzierungspotenzials sind (Battula *et al*, 2007; Kastrinaki *et al*, 2008; Roche *et al*, 2009; Vogel *et al*, 2003). So konnten Wegmeyer *et al.* sowie Wang *et al.* Unterschiede in der Expression bestimmter Gene für NGR1 (*negativ growth regulator protein 1*), PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), CXCL2, CXCL3 (*chemokine C-X-C motif ligand 2 und 3*), sowie TNFAIP6 (*tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*) und parakriner Faktoren, wie HGF (*hepatocyte growth factor*), b-FGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*), SDF-1a (*stromal cell derived factor 1a*), IL-1ra (Interleukin 1 Rezeptorantagonist), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und IL 8 (Interleukin 8), zwischen MSCs, die aus Nabelschnurblut, Amnion oder aus Knochenmark (BMSCs) gewonnen wurden, feststellen (Wang *et al*, 2015; Wegmeyer *et al*, 2013). Eine hohe Ähnlichkeit bezüglich des Phänotyps und Differenzierungspotenzials scheint zudem zwischen MSCs vorzuliegen, die aus Adipozyten und Knochenmark isoliert werden. Dies spricht für eine Austauschbarkeit in der zelltherapeutischen Anwendung (Roche *et al*, 2009).

1.2.3 Isolation und Expansion

An dieser Stelle wird ausschließlich die Isolation von MSCs aus humanem Knochenmark beschrieben werden, da in dieser Arbeit dieser Zelltyp verwendet wurde.

Die MSCs stellen mit einem Anteil von etwa 0,001-0,01 Prozent eine verhältnismäßig kleine Fraktion der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks dar (Pittenger *et al*, 1999). Mittels Jamshidi Vakuumaspiration aus der *Crista iliaca posterior* lassen sich wenige Milliliter Aspirat gewinnen (Mazzini *et al*, 2003). Zur Isolation von MSCs aus dem Aspirat wird üblicherweise eine Dichtezentrifugation unter Verwendung eines Percoll™- oder Ficoll™-Gradienten durchgeführt. Die dichten Zellen und Zell-Antikörper-Komplexe setzen sich am Boden ab, dann kommt Ficoll™, gefolgt von einer Interphase. Darüber entsteht eine Schicht aus mononukleären Zellen, welche die MSCs enthält (Marion und Mao, 2006). Die Zellen werden in Kulturgefäßen aus Plastik ausgesät und kultiviert. Ähnlich wie somatische Zellen unterliegen MSCs mit jeder Zellteilung einer Telomerverkürzung, welche letztendlich zum Stillstand der Proliferation führen könnte. Mittels Telomerase kann die Lebensspanne der Zelle deutlich verlängert werden (Derubeis und Cancedda, 2004). 2002 entwickelten Osyczka *et al*. eine MSC-Zelllinie, die durch Infektion der primären MSCs mit dem humanen Papillomavirus Typ 16, Gen E6/E7, über einen viralen Vector immortalisiert wurde (Osyczka *et al*, 2002).

1.2.4 Differenzierung von MSCs in Richtung der osteoblastären Zellreihe

An dieser Stelle soll auf die osteoblastäre Differenzierung eingegangen werden, welche für die Fragestellung dieser Arbeit relevant ist. Die Differenzierung von MSCs in Adipozyten wird anschließend kurz vorgestellt.

Die osteogene Differenzierung war die zuerst identifizierte Zellreihe in der Differenzierung von MSCs (Friedenstein *et al*, 1970, 1976; Owen und Friedenstein, 1988). Diese MSCs differenzieren als Antwort auf multiple Stimuli, welche weiter unten aufgeführt werden, über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten zu Osteoblasten und Osteozyten (Franz-Odenaal *et al*, 2006). Die verschiedenen Entwicklungsstufen der osteogenen Zelllinie unterscheiden sich in ihrer Morphologie, in der Expression verschiedener Proteine und von Extrazellulärmatrix sowie in ihrer enzymatischen Aktivität (Noda und Camilliere, 1989).

Im Gegensatz zu Präosteoblasten sind Osteoblasten morphologisch kuboidale Zellen, die Osteocalcin (OC), Osteonectin (ON), *bone sialoprotein* (BSP) und Alkalische Phosphatase (ALP) exprimieren (Noda und Camilliere, 1989). Von den Osteoblasten reifen nur ca. 30-50% zu Osteozyten, die restlichen Zellen gehen in Apoptose (Bran *et al*, 2008). Während des *in vivo* etwa dreitägigen Übergangs von Osteoblasten in Osteozyten verlieren die Zellen ca. 30% ihres Volumens und produzieren ein Vielfaches ihres Eigenvolumens an extrazellulärer Knochenmatrix (Palumbo *et al*, 1990).

Zahlreiche Arbeiten haben sich damit beschäftigt, welche Stimulanzen die Differenzierung von isolierten MSCs in Osteoblasten induzieren: Es konnte ein Anstieg der Aktivität der ALP als Marker für osteoblastären Metabolismus (Hoemann *et al*, 2009) nach 7-14 Tagen Kultivierung in Anwesenheit von 0,1 μ M Dexamethason, 50 μ g/ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (AsAP) und 0,1 μ M β -Glycerolphosphat festgestellt werden (Alhadlaq und Mao, 2003, 2005; Bruedigam *et al*, 2011; Marion und Mao, 2006). Diese Kombination aus Dexamethason, AsAP und β -Glycerolphosphat wird im Folgenden als DAG bezeichnet. Eine längerfristige Exposition von DAG auf MSCs führt zur Expression einer extrazellulären Kalziumphosphatmatrix (Eijken *et al*, 2007; Id Boufker *et al*, 2010) und zur gesteigerten Expression der osteoblastären Marker Osteopontin (OP), BSP (Id Boufker *et al*, 2010), ON und OC (Marion und Mao, 2006).

Das Dexamethason kann die Differenzierung von MSCs dosisabhängig beeinflussen; so induzieren hohe Dexamethason Dosen in MSCs eine Differenzierung zu Adipozyten, niedrige Dosen dagegen eine osteoblastäre Differenzierung (Bruder *et al*, 1997). Die Zugabe von AsAP fördert die Kollagenbiosynthese und besitzt zusätzlich stimulierende Effekte auf die Zellproliferation (Jaiswal *et al*, 1997). β -Glycerolphosphat stimuliert in Kombination mit Dexamethason und AsAP die Ausbildung der extrazellulären Kalziumphosphatmatrix, ein Prozess, der in Abwesenheit von β -Glycerolphosphat langsamer erfolgt (Jaiswal *et al*, 1997).

Darüber hinaus induzieren einige Vertreter der Familie der *bone morphogenic proteins* (BMPs) osteoblastäre Differenzierung, einschließlich BMP-2, BMP-6 und BMP-9 (Dayoub *et al*, 2003; Friedman *et al*, 2006; Jäger *et al*, 2008a). Meist wird BMP-2 in Kombination mit Dexamethason zur Stimulation der osteoblastären Differenzierung verwendet (Jäger *et al*, 2008a; Rickard *et al*, 1994).

Zum Nachweis der osteoblastären Differenzierung werden verschiedene Marker untersucht, wie Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmoleküle, Extrazellulärmatrix, Enzymaktivität oder Proteine, die auf die metabolische Aktivität von Osteoblasten hinweisen (Marion und Mao, 2006; Zilkens *et al.*, 2010). Der Transkriptionsfaktor *Runx-related transcription factor 2* (Runx2) steigert die Expression knochenspezifischer Gene, zum Beispiel Osterix (OSX), Collagen Typ 1 alpha-1 (Col1A1), OC und BSP, indem es an die Promotoren dieser Gene bindet (Long, 2001; Zilkens *et al.*, 2010). Neben Runx2 und COL1A1 gelten als frühe Marker (7-14 Tage nach Aussaat) die ALP-Aktivität (Aubin, 1998), *transforming growth factor-beta 1* (TGFβ1), ON und BMP-2 (Zilkens *et al.*, 2010); späte Marker für osteoblastäre Differenzierung sind BSP, OP, OC und ON (Aubin, 1998; Rodan und Noda, 1991; Zilkens *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurden zum Nachweis osteoblastärer Differenzierung das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors Runx2, der Strukturproteine Kollagen 1 (Col1) (Schünke *et al.* 2000) und OC (Wada und Kamiya, 2006) sowie die ALP-Aktivität bestimmt.

Zusätzlich wurde das Vorhandensein des *Helix-loop-helix* (HLH)-Transkriptionsfaktors *Twist-related protein 1* (Twist) untersucht (Zhang *et al.*, 2008b): Twist gilt als Gegenspieler zu Runx2 (Manokawinchoke *et al.*, 2014) und als negativer Regulator der osteoblastären Differenzierung (Miraoui *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014); die antiosteogene Funktion wird über eine spezielle Domäne, die sogenannte Twist-Box vermittelt. Sie interagiert durch DNA-Bindung mit der Runx2-Bindungsdomäne (sog. Runt) und hemmt so die Funktion von Runx2 (Bialek *et al.*, 2004).

In der Literatur gibt es gegensätzliche Ergebnisse, ob durch Twist-Überexpression die Expression von Runx2 vermindert (Zhang *et al.*, 2014) oder ob nur die Funktion, nicht aber die Expression von Runx2 gehemmt wird (Bialek *et al.*, 2004; Komaki *et al.*, 2007). Als gesichert gilt jedoch, dass die Expression der Marker OC und ALP durch Twist-Expression verringert wird (Zhang *et al.*, 2008b).

Biochemisch unterliegt die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten einer Reihe von Proteinen und Hormonen, deren Bedeutung jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (siehe Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des BMP/Smad- und Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweges. Scl: Sclerostin, PTH: Parathormon, BMP: *bone morphogenetic protein*, FZD: *frizzled receptor*, LPR: *lipoprotein-like receptor* (modifiziert nach ten Dijke *et al.*, 2008). Eine zentrale Rolle nehmen die Proteine der *Wingless* (Wnt)-Familie sowie der TGF-β-Familie ein, darunter die BMPs 2, 7 und 9 (Luther *et al.*, 2011; Neumann und Schett, 2007; Taşlı *et al.*, 2014).

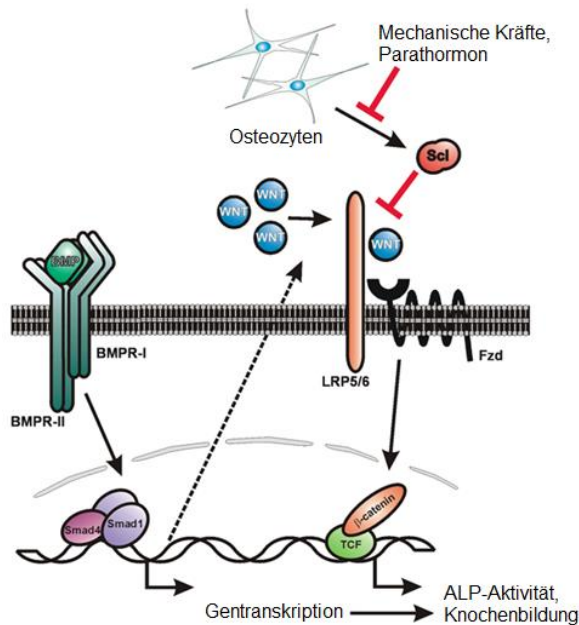


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des BMP/Smad- und Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweges. Scl: Sclerostin, PTH: Parathormon, BMP: *bone morphogenetic protein*, FZD: *frizzled receptor*, LPR: *lipoprotein-like receptor* (modifiziert nach ten Dijke *et al*, 2008)

Sowohl durch die Wnt-Signaltransduktion als auch durch TGF-β wird die chondrogene und osteoblastäre Differenzierung über eine vermehrte Expression von Runx2 gesteigert (Arita *et al*, 2011; McCarthy und Centrella, 2010). Runx1 steuert die hämatopoetische (Lam und Zhang, 2012) und Runx3 die neuronale Differenzierung (Dykes *et al*, 2010).

Die Bindung von BMPs an den BMP-Typ-II-Rezeptor, einem heterodimeren Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor (Knaus und Sebald, 2001), führt mittels Smad-Proteinen zu einer Signaltransduktion in den Zellkern, welche im Verbund mit Co-Aktivatoren die Transkription osteoblastentypischer Gene induziert, beispielsweise COL1A1 (Balint *et al*, 2003; Knaus und Sebald, 2001; Ryoo *et al*, 2006).

Ein weiterer Signalweg führt durch Bindung von Wnt3a Proteinen am sogenannten *lipoprotein-like receptor* (LPR) 5/6 zu einer intrazellulären Akkumulation von β-Catenin, welches im Zellkern an Transkriptionsfaktoren der *T-cell-factor* (TCF)-Familie bindet und so die Osteoblastendifferenzierung fördert (Glass und Karsenty, 2006; Krishnan *et al*, 2006; Schmidt, 2009). Sclerostin, ein Produkt des SOST-Gens, ist ein Ligand des LPR 5/6, der den Wnt/β-Catenin-Signalweg hemmt und somit ein Antagonist der Osteoblastendifferenzierung ist (Capulli *et al*, 2014; Li *et al*, 2005).

Ein dritter Signalweg für die Regulierung der Differenzierung von MSCs ist die Signaltransduktion über *Notch*-Rezeptoren (Zhu *et al*, 2013). Bislang sind vier *Notch*-Rezeptoren (*Notch 1-4*) und fünf Liganden (*Jagged-1*, *Jagged-2*, *Delta-like-1*, *Delta-like-3* und *Delta-like-4*) identifiziert. Eine Bindung von Jagged-1 (Jag1) an *Notch*-Rezeptoren führt zur proteolytischen Freisetzung der *Notch intracellular domain* (NICD) (Ehebauer *et al*, 2006; Hurlbut *et al*, 2007).

Die NICD wandert aus dem Zytoplasma zum Zellkern und initiiert über *DNA*-Bindung die Transkription von Zielgenen, indem es mit dem *DNA binding CSL/RBP-J-protein*, dem Transkriptions-Coaktivator *mastermind-like* (MAML) und anderen Transkriptionsfaktoren interagiert (Honjo, 1996; Zhu *et al*, 2013).

Die Bildung dieses Dreifachkomplexes aus NICD, CSL und MAML ist Voraussetzung für die erfolgreiche Transkription über den *Notch*-Signalweg und führt zur Expression von Hey1, einem *Helix-loop-helix*-Protein, welches einen wichtigen Mediator in der BMP-9-induzierten osteoblastären Differenzierung darstellt (Sharff *et al*, 2009).

In humanen MSCs wird im Gegensatz zu murinen MSCs (Deregowski *et al*, 2006; Engin *et al*, 2008; Hilton *et al*, 2008; Salie *et al*, 2010) die Osteoblastengenese über den *Notch*-Signaltransduktionsweg induziert und osteogene Markergene, ALP und BSP vermehrt exprimiert; zudem wird die ALP-Aktivität und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix gefördert (Zhu *et al*, 2013).

Weitere Faktoren, die die osteoblastäre Differenzierung fördern, sind Mobilisation, Parathormon (PTH), *fibrioblast growth factor* (FGF) und *Insuline like growth factor-1* (IGF-1) (Ohata und Ozono, 2014). Außerdem stehen MSCs in Abhängigkeit ihrer anatomischen Lokalisation in ständiger Interaktion mit unterschiedlichen Zelltypen ihrer Umgebung (Bara *et al*, 2014). Man geht davon aus, dass sich MSCs im Knochenmark in bestimmten endostealen, stromalen und perivaskulären Nischen befinden (Méndez-Ferrer *et al*, 2010; da Silva Meirelles *et al*, 2008). Es ist noch ungeklärt, ob die MSC-Populationen einer Nische isoliert und selbsterneuernd vorliegen, ob sie in andere Nischen migrieren, oder ob sie funktionelle Unterschiede ausbilden können (Bara *et al*, 2014). MSCs teilen im Knochenmark ihre Umgebung mit hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und Osteoblasten. Diese drei Zelltypen interagieren abhängig von ihrer Nische über Wachstumsfaktoren und Zytokine miteinander und können so das Verhalten der anderen Zelltypen beeinflussen, beispielsweise stimulieren HSCs über den BMP2- und BMP6-Signalweg die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten (Bara *et al*, 2014).

Die Erforschung eines *in vitro* verwendbaren MSCs-Nischenmodells, mit dem MSCs in ihrem ursprünglichen multipotenten Zustand kultiviert und reguliert werden könnten, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und könnte dazu beitragen, ökonomischere und klinisch effektivere Zelltherapien zu entwickeln (Bara *et al*, 2014).

Auch Prostaglandine sind in der Lage, die Osteoblastendifferenzierung zu beeinflussen. Das PGE₂ ist das wohl am meisten untersuchte Prostaglandin (Haversath *et al*, 2012). Es wird bei Frakturen, nach muskuloskelettalen Eingriffen, bei entzündlichen Prozessen, wie der Osteoarthritis, und auch bei HO vermehrt nachgewiesen (O'Keefe *et al*, 2006; Tseng *et al*, 2010). Es ist bekannt, dass es vor allem über die G-Protein-gekoppelten Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 durch eine Erhöhung des *second messengers* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und damit einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) die osteoblastäre Differenzierung fördert und vermehrt Cyclooxygenase 2 (COX2) exprimiert wird, wodurch es autogen die Synthese von neuem PGE₂ bewirkt (Choudhary *et al*, 2008; Graham *et al*, 2009; Hakeda *et al*, 1986; Paralkar *et al*, 2003; Suda *et al*, 1998). Des Weiteren induziert es die Bildung von BMP2, welches wie auch PGE₂ über einen Map-Kinase-abhängigen Signalweg letztendlich die Expression von OC, OP und ALP steigert (Minamizaki *et al*, 2009; Ryoo *et al*, 2006). Vermutlich haben PGE₂ und BMP2 über diesen Signalweg synergistische Effekte auf die osteoblastäre Differenzierung (Graham *et al*, 2009; Haversath *et al*, 2012; Nakagawa *et al*, 2007).

Im Mausmodell konnten Kamolratanakul *et al*. zeigen, dass größere Knochendefekte durch eine Kombination aus einem selektiven EP4-Agonisten und BMP2 auf einem nanogel-basierten Träger zur Abheilung gebracht werden konnten (Kamolratanakul *et al*, 2011).

Eine selektive wie auch nicht-selektive Hemmung der Cyclooxygenase durch NSAIDs wie Indomethacin führt somit zu niedrigeren PGE₂- und BMP2-Spiegeln im Fraktur- oder Entzündungsgebiet (Rapuano *et al*, 2008). Zhang *et al*. und Naik *et al*. zeigten, dass Mäuse ohne COX2 bzw. mit reduzierter COX2-Expression eine deutliche Verzögerung der Knochenheilung nach Verletzungen aufwiesen (Naik *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2002).

1.2.5 Differenzierung von MSCs in Richtung der adipogenen Zelllinie

MSCs differenzieren unter Kulturbedingungen durch Zugabe von Dexamethason (0,5 μ M), 1-Methyl-3-Isobutylxanthin (IBMX) (0,5 μ M-0,5 mM) und Indomethacin (50-100 μ M) zu Adipozyten (Alhadlaq und Mao, 2004, 2005; Gregory *et al*, 2005; Pittenger *et al*, 1999). Mit 0,5 μ M ist hierbei die Dexamethasonkonzentration fünfmal höher als in DAG zur osteoblastären Differenzierung. IBMX ist ein Phosphodiesteraseinhibitor, der die Konversion von cAMP zu 5'AMP blockiert, was zur Hochregulation von Proteinkinase A (PKA) und verminderter Zellproliferation führt (Gregory *et al*, 2005).

Indomethacin ist ein Ligand des *peroxysome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), einem frühen essenziellen Transkriptionsfaktor, der Adipogenese und die Osteoblastengnese unterdrückt (Gregory *et al*, 2005; Rosen und Spiegelman, 2000; Takada *et al*, 2009). Über die klassische Wnt-Signalkaskade wird die Expression von PPAR γ *messenger ribonuclein acid* (mRNA) gehemmt, daher kann über diesen Signalweg die osteogene und adipogene Differenzierung reguliert und balanciert werden (Gregory *et al*, 2005; Marion und Mao, 2006). Unter diesem Gesichtspunkt stellt sich die Frage, ob das in dieser Arbeit zum Kulturmedium der MSCs hinzugefügte Indomethacin eine Differenzierung in die osteogene Zelllinie ganz oder teilweise unterdrückt.

1.2.6 Verwendungsmöglichkeiten

MSCs bieten sich durch ihr osteogenes, adipogenes und cartilagenes Differenzierungspotential für diverse therapeutische Konzepte an. Vor allem Patienten mit großen Knochendefekten oder einer verminderten Knochenregeneration sollen von den potenziellen Therapieansätzen profitieren (Bary und Murphy, 2003).

Ein potenzielles klinisches Anwendungsgebiet ist die Applikation und Behandlung von Knorpel- und Knochenläsionen bei Rheumatoider Arthritis (Sonomoto *et al*, 2014). Eine stammzellbasierte orthopädische Therapie beinhaltet die allogene Transplantation von Knochenmarkstammzellen bei Patienten, die an Osteogenesis imperfecta leiden, einer genetischen Erkrankung, bei der Osteoblasten defektes Kollagen Typ I synthetisieren. Horwitz *et al*. zeigten 2002, dass diese Therapie, angewandt an fünf Kindern mit *Osteogenesis imperfecta*, zu einer deutlichen Steigerung der Knochenmineralisierung sowie zu einem größeren Körperlängenwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Horwitz *et al*, 2002).

1.3 Verwendete Moleküle

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Moleküle Indomethacin und Iloprost genauer beschrieben werden.

1.3.1 Indomethacin

Indomethacin wurde in dieser Arbeit verwendet, da es als ein Vertreter der NSAIDs häufig in der postoperativen Schmerztherapie nach muskuloskelettalen Eingriffen eingesetzt wird. Nach diesen Eingriffen ist eine Differenzierung von MSCs in Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe maßgeblich für die Wundheilung. Zudem haben mehrere Studien gezeigt, dass es die Knochenregeneration und -neubildung hemmt (Brüedigam *et al*, 2011; Persson *et al*, 2005); ein Effekt, den man sich in der Prophylaxe Heterotoper Ossifikation zu Nutze macht (Firoozabadi *et al*, 2014; Scott *et al*, 2012). Außerdem inhibiert es die Cyclooxygenasen 1 und 2 und somit die Synthese von Prostaglandinen, welche regulierend in die osteoblastäre Differenzierung von MSCs eingreifen (Haversath *et al*, 2012).

1.3.1.1 Wirkungen von Indomethacin

Indomethacin wirkt über die nicht-selektive Blockade der Isoenzyme Cyclooxygenase 1 (COX1) und Cyclooxygenase 2 (COX2) (Kawai, 1998), welche die Reaktion des Phospholipids Arachidonsäure zu den biologisch aktiven Prostanoiden und Thromboxanen katalysieren (Fitzpatrick, 2004). In einer komplexen Reaktionskette entstehen aus Arachidonsäure zunächst mittels Cyclooxygenase Prostaglandin (PG) G_2 und daraus mittels Peroxidase PGH_2 , welches durch die Enzyme Thromboxansynthetase und Prostazyklinsynthetase zu Thromboxan A_2 , Prostazyklin (PGI_2) sowie die Prostaglandine E_2 , F_2 und D_2 verstoffwechselt wird (Helliwell *et al*, 2004). Thromboxan A_2 dient der Plättchenaggregation und der Vasokonstriktion (Dormandy, 1996). Prostazyklin bewirkt eine Thrombozytenaggregationshemmung, eine Vasodilatation und besitzt antiproliferative Effekte auf Endothelzellen (Grant und Goa, 1992; Krause und Kraus, 1986; Rainsford, 2007; Schermuly *et al*, 2004); Prostaglandin E_2 verursacht eine Hyperalgie durch Sensibilisierung der freien Nervenendigungen, Bronchodilatation, Exsudation, Vasodilatation und Zytoprotektion der Magen-Darm-Schleimhaut (Brzozowski *et al*, 2005; Omori *et al*, 2014). Prostaglandine können darüber hinaus die Zellproliferation beeinflussen und so zum Beispiel eine Steigerung des Tumorzellwachstums hervorrufen (Cahlin *et al*, 2000; Quidville *et al*, 2006).

Die Blockade der Isoenzyme der COX1 und COX2 bewirkt unterschiedliche Effekte, welche in Abbildung 2 dargestellt sind.

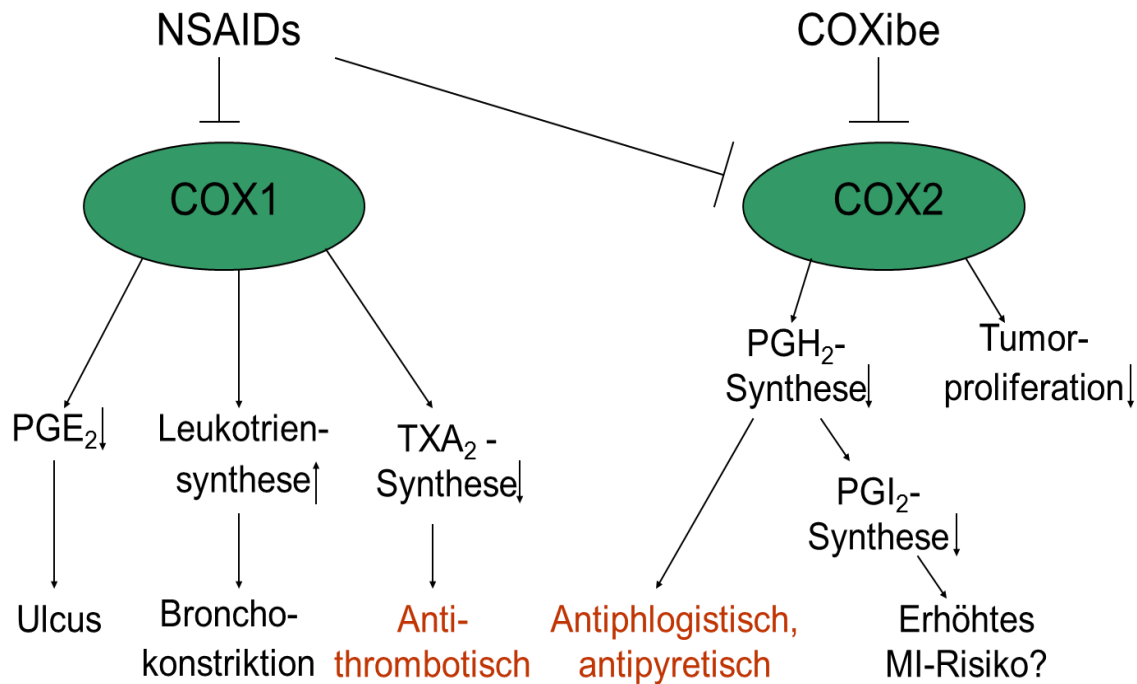


Abbildung 2: Wirkungen durch nicht-selektive (NSAIDs) und selektive (COXibe) Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren. NSAIDs inhibieren COX1 und 2, COXibe die COX2; dadurch wird die Katalyse von Arachidonsäure zum jeweiligen Produkt gehemmt (↓) oder begünstigt (↑). Die therapeutisch gewünschten Wirkungen sind rot hervorgehoben. NSAIDs = *non steroidal anti-rheumatic drugs*; PGE₂ = Prostaglandin E₂; PGI₂ = Prostaglandin I₂ (Prostazyklin); PGH₂ = Prostaglandin H₂; TXA₂ = Thromboxan A₂; MI = Myokardinfarkt (Eigene Darstellung, abgeleitet aus Bertolini *et al*, 2001; Rainsford, 2007; Simmons *et al*, 2004).

Für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist der *in vitro* (Bruedigam *et al*, 2011; Chang *et al*, 2005, 2009; Ho *et al*, 1999) und *in vivo* (DiCesare *et al*, 1991; Fracon *et al*, 2008; Keller *et al*, 1989; Nilsson *et al*, 1986, 1986, 1986; Persson *et al*, 2005; Törnkvist *et al*, 1985) nachgewiesene osteosuppressive Effekt von Indomethacin. Ein klinisches Beispiel dafür ist die erfolgreiche therapeutische Anwendung in der Prophylaxe der Heterotopen Ossifikation (Firoozabadi *et al*, 2014; Grohs *et al*, 2007; van der Heide *et al*, 2007; Moed und Letournel, 1994; Scott *et al*, 2012; Tsailas *et al*, 2009).

1.3.2 Iloprost

In dieser Arbeit wurden MSCs *in vitro* mit dem Prostazyklinanalogon Iloprost beimpft, um dessen Einfluss auf die Differenzierung und die Proliferation dieser Zellen zu untersuchen. Im Gegensatz zum PGE₂ ist die Rolle von PGI₂ auf dem Gebiet der Knochenneubildung und -regeneration bisher wenig untersucht. Klinisch findet das Prostazyklinanalogon unter anderem Anwendung in der Behandlung von Knochenmarködem und avaskulärer Osteonekrose (Jäger *et al*, 2011b), häufig in Kombination mit dem analgetisch und antiphlogistisch wirksamen Indomethacin, dessen osteosuppressive Effekte bereits in mehreren Studien nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 1.3.1.1). Da Iloprost über die Bindung an den IP-Rezeptor zu einem cAMP-Anstieg in der Zelle führt (Whittle *et al*, 2012), scheint eine Förderung der osteoblastären Differenzierung wahrscheinlich; womöglich lassen sich die osteosuppressiven Effekte durch Indomethacin ganz oder teilweise antagonisieren.

Iloprost (Ilo) ist ein chemisch stabiles Derivat des Prostazyklins besitzt durch seine molekulare Ähnlichkeit zum natürlichen PGI₂ hohe Affinität zum humanen G-Protein gekoppelten Prostazyklinrezeptor (IP-Rezeptor) (Grant und Goa, 1992). Durch Rezeptorbindung des Liganden (PGI₂, *first messenger*) kommt es zur Guonosintriphosphat (GTP)-abhängigen Abspaltung der aktivierten α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche unabhängig voneinander an unterschiedliche Effektoren binden (Tuteja, 2009). So werden unter anderem die Adenylylcyclase und die Phospholipase C aktiviert, was zu einem Anstieg der *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und Calcium führt (Caers *et al*, 2014).

1.3.2.1 Wirkungen von Iloprost

Endogenes Prostazyklin hat bei einer Temperatur von 37°C eine Halbwertszeit von etwa 4 Minuten (Gryglewski, 2008), das physikochemisch stabilere Iloprost von etwa 30 Minuten (Krause und Krais, 1986). Die längere Halbwertszeit gegenüber endogenem Prostazyklin erlaubt die therapeutische intravenöse, subkutane und inhalative Anwendung von Iloprost (Olschewski, 2009). Über den G-Protein-vermittelten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels wird die Plättchenaggregation reversibel gehemmt (Caers *et al*, 2014; Gorman *et al*, 1977; Grant und Goa, 1992; Darius *et al*, 1986; Fitscha *et al*, 1987a, 1987b; Johnson *et al*, 1984). Ebenfalls kommt es durch den Anstieg des cAMP es zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in das sarkoplasmatische Retikulum von glatten Muskelzellen, so dass diese relaxieren und in Gefäßen eine Vasodilatation ausgelöst wird (Pfitzer, 2001).

Außerdem wirkt Iloprost den vasospastischen Effekten der Leukotriene, des Thromboxan A_2 und des *endothelium derived constricting factors* (EDCF) an der glatten Muskulatur der Arterien entgegen (Dogné *et al*, 2000; Haurand und Flohé, 1989; Olschewski *et al*, 2002). Neben vasodilatativen Effekten besitzt Iloprost profibrinolytische (Dibble *et al*, 1988) und antiproliferative Eigenschaften (Hoeper *et al*, 2000; McLaughlin *et al*, 1999). Therapeutisch wird es daher bei Sklerodermie (Stratton *et al*, 2001), Raynaud-Syndrom (Mittag *et al*, 2001) Thrombangitis obliterans (Fachinformation Ilomedin® 20/50, 2010) und pulmonalarterieller Hypertonie eingesetzt (Phillips *et al*, 2005; Schermuly *et al*, 2004). Ein weiteres aktuelles Anwendungsgebiet ist die Behandlung von Knochenmarködemen (*Bone marrow oedema*, BMO) und avaskulären Knochennekrosen (AVN) (Jäger *et al*, 2011b).

Zusammenfassend lassen sich folgende Wirkungen von Iloprost aufzählen, die in der Therapie von Bedeutung sind:

- pulmonale Vasodilatation
- Dilatation von Arteriolen und Venolen in der Mikrozirkulation
- Inhibition der Thrombozytenaktivierung (Aggregation, Adhäsion, Freisetzung von Mediatoren)
- Inhibition der Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten
- Inhibition des *remodelling* glatter Muskelzellen
- Aktivierung des endogenen fibrinolytischen Potenzials

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, welchen Einfluss Indomethacin und Iloprost alleine oder in Kombination auf die Proliferation und osteoblastäre Differenzierung mesenchymaler Stromazellen aus humanem Knochenmark *in vitro* nehmen. Therapeutischer Hintergrund dieser Zielsetzung ist, dass Indomethacin zur postoperativen Schmerzbehandlung, in der Behandlung von Arthritiden, in der Behandlung des Knochenmarködems und zur Prophylaxe von Heterotoper Ossifikation nach Operationen oder Traumata eingesetzt wird (Firoozabadi *et al*, 2014; Haversath *et al*, 2012), gleichzeitig jedoch die osteoblastäre Differenzierung zu hemmen scheint und es Hinweise auf vorzeitige Endoprothesenlockerung unter Behandlung mit NSAIDs gibt (Chang *et al*, 2005; Ho *et al*, 1999; Persson *et al*, 2005). Iloprost führt allem Anschein nach zu einer Schmerzlinderung und gesteigerten Gelenkbeweglichkeit bei Patienten mit Knochenmarködem und avaskulärer Osteonekrose (Jäger *et al*, 2011b; Olschewski *et al*, 2002). MSCs aus konzentriertem Knochenmarkaspirat beschleunigen die Heilung volumetrischer Knochendefekte und stellen eine vielversprechende Alternative zum *allograft* dar (Jäger *et al*, 2011a).

Bislang gibt es keine relevanten Publikationen, in denen die Kombination dieser beiden Medikamente *in vitro* oder *in vivo* auf dem Zellsystem der MSCs angewendet wurden.

2 Material und Methoden

Eine tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien, Antikörper und Geräte befindet sich im Anhang.

2.1 Versuchsaufbau

Humane Knochenmarkzellen von insgesamt acht verschiedenen gesunden Spendern wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert, expandiert und ihr mesenchymaler Stromazellcharakter über eine durchflusszytometrische Analyse bestimmter Antigene kontrolliert (CD105+CD73+CD45-CD14-). Ergänzend wurden CD105, CD34 und CD45 immunzytochemisch und mittels RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) untersucht. Die Kultivierung erfolgte über 28 Tage ohne DAG (Dexamethason-Ascorbinsäure- β -Glycerolphosphat) Stimulation mit 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M Indomethacin (Indo) mit und ohne Zusatz von 10^{-7} M Iloprost (Ilo) sowie als Kontrolle ohne Medikamentenzugabe und mit alleiniger Zugabe von 10^{-7} M Iloprost. Jede Medikamentenkonzentration und -kombination wurde an jeweils 3 Spenderzellreihen getestet (siehe Tabelle 1).

| 0 | 0+Ilo | 10^{-6} M | 10^{-5} M | 10^{-4} M | 10^{-6} M+Ilo | 10^{-5} M+Ilo | 10^{-4} M+Ilo |
|--|-------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | A | A | E | A | A | A | A |
| B | B | B* | B | B | B | B | B |
| C | G | F | D | D | C | C | C |
| H als Kontrolle im CytoTox®96-, BCA- und ALP-Assay im zeitlichen Verlauf | | | | | | | |

Tabelle 1: Zuordnung von Indomethacin-Konzentration und Iloprost-Zugabe (10^{-7} M) zur in dieser Konzentration kultivierten Zellreihe des Spenders. *Im Versuchsansatz mit 10^{-6} M Indomethacin der MSCs von Spender B stellte sich nachträglich ein Fehler in der Konzentrationsberechnung heraus, so dass dieser Versuchsansatz nicht ausgewertet werden konnte.

Die Erneuerung des Kulturmediums fand im Wechsel von 3 und 4 Tagen statt. Das Medium wurde dazu jedes Mal frisch angesetzt. Nach 10 und nach 28 Tagen wurden die Zellproliferation (CytoTox96® *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, Promega, Mannheim, Deutschland), die Proteinkonzentration und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) gemessen (Enzymatic Assay of Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Zur Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität wurde die ALP-Aktivität in Relation zum Gesamtprotein gesetzt, das mittels Bicinchoninsäure-Assay gemessen wurde (BCA, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA).

Die osteoblastäre Differenzierung wurde auf der Expressionsebene über *RNA*-Isolation und RT-PCR sowie auf der Proteinebene mittels Immunzytochemie auf die Marker Runx2, Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), (ALP) sowie den osteoblasteninhibitorischen Transkriptionsfaktor Twist untersucht.

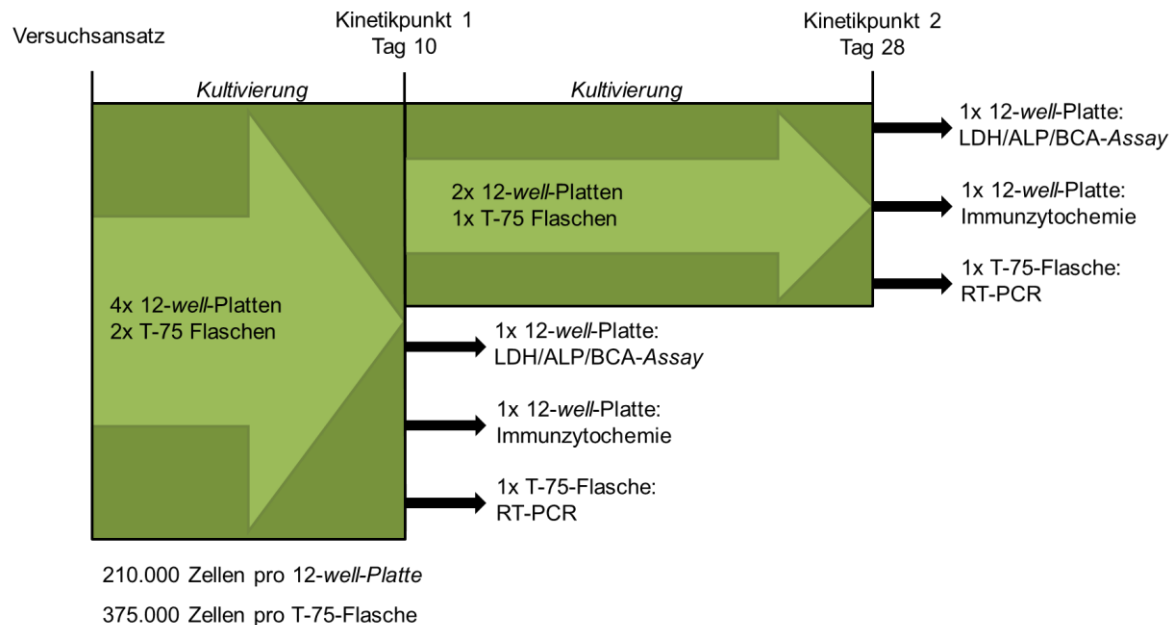


Abbildung 3: Überblick über den Versuchsaufbau mit Angabe der durchgeführten Versuche an den Kinetikpunkten 1 (Tag 10) und 2 (Tag 28).

2.2 Knochenmarkspender

Die Knochenmarkspender waren zum Zeitpunkt des ersten Versuchsansatzes im April 2008 zwischen 17 und 75 Jahre alt, davon sind sieben männlich, einer weiblich (siehe Tabelle 2). Sie erfüllten die Ein- und Ausschlusskriterien zur primären Knochenmarktransplantation nach den Richtlinien der Bundesärztekammer.

Die Gewinnung autologen Knochenmarks erfolgte nach ausführlicher und rechtskräftiger mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Einverständniserklärung der Spender in Zusammenarbeit mit dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie des Universitätsklinikums Düsseldorf im Jahre 2008.

Ein generelles Ethikvotum (#3096/2008) zur Untersuchung von humanem Knochenmark lag darüber hinaus im Rahmen einer Kooperation der Klinik für Orthopädie mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf vor. Die Knochenmarkpunktion erfolgte bei allen Spendern in der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

| Spender | Alter zum Versuchszeitpunkt [Jahre] | Geschlecht | Passage |
|---------|---|------------|---------|
| A | 26 | Männlich | 1 |
| B | 25 | Weiblich | 2 |
| C | 38 | Männlich | 1 |
| D | 39 | Männlich | 1 |
| E | 59 | Männlich | 1 |
| F | 30 | Männlich | 3 |
| G | 75 | Männlich | 1 |
| H | 17 | Männlich | 1 |

Tabelle 2: Alter und Geschlecht der Knochenmarkspender und Anzahl der durchgeführten Passagen der gewonnenen Knochenmarkprogenitorzellen.

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung und Aufarbeitung von Knochenmarkstromazellen

Humanes Knochenmark wurde entsprechend einer standardisierten Prozedur aufgearbeitet (Jäger *et al*, 2011a):

Mittels einer Jamshidi-Vakuumaspiration wurde es aus der *spina iliaca posterior superior* gewonnen und mit den Antikoagulanzen *Acid Citrat Dextrose Antikoagulans* (ACDA *Formula A*, Harvest, München, Deutschland) sowie 2000 I.E. (internationale Einheiten) Heparin/ml versetzt. Unmittelbar nach Entnahme wurde das gewonnene Knochenmark für die anschließende Expansion und Kultivierung aufbereitet. Nach 1:1 Verdünnung mit PBS (*Phosphate buffered saline*, Zusammensetzung [mg/L]: NaCl 8000, KCl 200, Na₂HPO₄ 1150, KH₂HPO₄ 200, MgCl₂·6H₂O 100, CaCl₂ 100) wurde das verdünnte Knochenmarkspirat auf 10 ml eines Lymphozytenseparationsmediums auf Saccharosebasis (LSM 1077, PAA, Cölbe, Deutschland) mit einer Dichte von 1,077 g/ml im Falcon-Röhrchen (VWR, Darmstadt, Deutschland) aufgeschichtet und anschließend

mit 1800 Umdrehungen pro Minute (Upm) bei Raumtemperatur (RT, 20°C) mit Bremse auf 5 zentrifugiert (1800 Upm/RT/20 min, Zentrifuge Eppendorf 5810 R, Eppendorf, Hamburg Deutschland). Die Erythrozyten und Granulozyten setzen sich aufgrund ihrer höheren Dichte ($<1,077$ g/ml) unten im Falcon-Röhrchen ab. Darüber bildete sich eine klare Phase mit LSM 1077. Über dieser LSM 1077-Phase bildete sich eine Interphase (sog. *Buffy coat*) mit mononucleären Zellen (MNCs), welche neben Lymphozyten und Monozyten auch die MSCs enthielt. In der obersten Phase befand sich Blutplasma (siehe Abbildung 4).

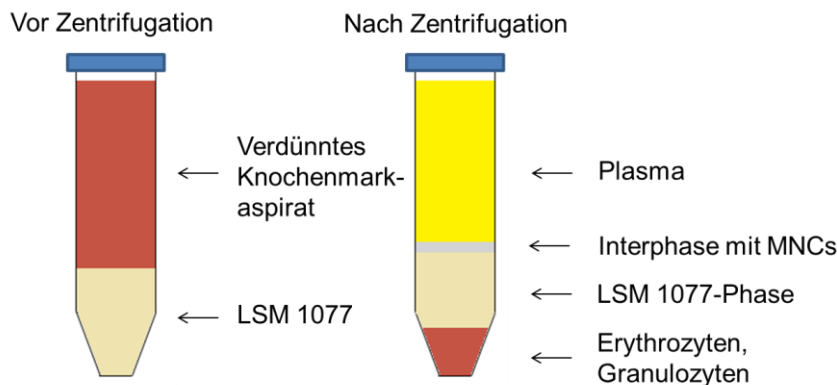


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Knochenmarkaspirat auf Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077 vor und nach Dichtegradientenzentrifugation. MNCs = mononucleäre Zellen (eigene Darstellung nach Radtke, 2014; Tripmacher, 2005).

Die entstandene Schicht mononucleärer Zellen wurde abpipettiert, mit 50 ml PBS versetzt und für fünf Minuten bei 1800 Upm/RT/5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Puffer dekantiert, das Zellpellet resuspendiert, darauf 20 ml PBS gegeben und ein weiteres Mal für fünf Minuten bei 1800 Upm/RT/5 min zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren des PBS und Resuspendieren des Zellpellets wurde dieses in 7 ml Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3.4) aufgenommen, in eine T25-Kulturflasche mit einer Bodenfläche von 25 cm² ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Expansion der MNCs

Das Kulturmedium wurde während der Expansion der MNCs zweimal wöchentlich gewechselt, wobei die noch nicht adhärenen Zellen mittels Zentrifugation für fünf Minuten bei 1800 Upm/RT/5 min sedimentiert, mit 7 ml Medium resuspendiert und in eine T25-Kulturflasche ausgesät wurden. Nach einer Kultivierung von einer Woche und einer 80-90% Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert.

Hierzu wurde Trypsin-EDTA (PAA, Cölbe Deutschland) im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt (für T25 Kulturflaschen 0,5 ml Trypsin-EDTA und 4,5 ml PBS) und auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde die Kulturflasche zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, 5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen bei 37°C für 5 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion (hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen durch Trypsin (Teich *et al*, 2006)) wurden 5 ml Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension im Falcon-Röhrchen bei 1800 Upm/RT/5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellett in 7 ml PBS resuspendiert. In einem weiteren Durchlauf wurde es bei 1800 Upm/RT/5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellett diesmal in 1 ml PBS aufgenommen. In der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt, dann zentrifugiert und nach Dekantierung und Resuspension in definierter Zahl von 5000 Zellen/cm² in T75-Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² überführt. Während der weiteren Kultivierung erfolgte der Mediumwechsel zweimal wöchentlich unter lichtmikroskopischer Kontrolle um das Zellwachstum, Adhärenz und Kontaminationen zu überprüfen (siehe Abbildung 5).

Sofern nach der Trypsinierung nicht ausreichend Zellen für die geplanten Versuchsansätze vorhanden waren, so wurden die Zellen in mehrere Aliquots aufgeteilt und in neue Kulturgefäße überführt, wo die Kultivierung mit frischem Medium weitergeführt wurde, bis eine ausreichende Gesamtzellzahl von ca. $2,6 \times 10^6$ Zellen erreicht war. Dieser Schritt der Subkultivierung zur Zellvermehrung beschreibt eine Zellpassage.

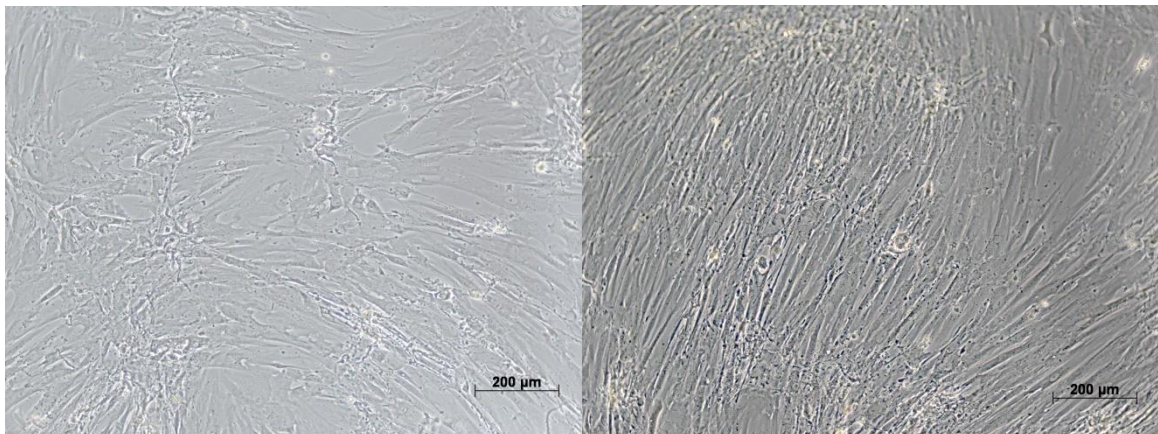


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Kontrolle (100-fache Vergrößerung) nach 7 Tagen (links) und 12 Tagen (rechts) Anzucht der MNCs von Spender B ohne Zusatz von Indomethacin oder Iloprost. Erkennbar sind die zunehmenden fibroblastenartigen Zellausläufer, was lichtmikroskopisch auf MSCs hindeutet.

2.3.3 Bestimmung des mesenchymalen Charakters

Vor jedem Versuchsansatz wurde eine durchflusszytometrische Analyse der expandierten MNCs durchgeführt, um den Anteil an mesenchymalen Stromazellen (MSCs) zu bestimmen.

2.3.3.1 Aufbereitung der MNCs

1×10^6 Zellen wurden in ein Zytometrie-Röhrchen (tubes polypropyle (#352005, 5 ml, 12x75 mm) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit Kulturmedium auf Eis gegeben und bei 1800 Upm/RT/8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Isoton® II-Puffer (Coulter, Krefeld, Deutschland) mit 4% *fetal calf serum* (FCS, PAA, Cölbe, Deutschland) zur osmotischen Lyse residueller Erythrozyten resuspendiert und auf zwei Zytometrie-Röhrchen aufgeteilt. 4 µl muriner Primärantikörper (Biozol, Eching, Deutschland) wurden zu den Zellen gegeben und 2 µl zur Isotypenkontrolle. In alle Röhrchen wurden nun 2 µl 7-Aminoactinomycin (7-AAD), gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Isoton® II-Puffer zugegeben und bei 1800 Upm/RT/8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl Isotone® II-Puffer resuspendiert, die Röhrchen anschließend verschlossen und auf Eis zum Durchflusszytometer (Cytomics FC500 *Flow Cytometrie Systems*, Beckman, Brea, USA) ins Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie (ITZ, Institutsleitung Dr.med. J. Fischer) des Universitätsklinikums Düsseldorf transportiert.

2.3.3.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches es ermöglicht, einzelne Zellen einer Zellpopulation in Bezug auf Größe, Form und Oberflächenstruktur zu differenzieren und quantifizieren (Fulwyler, 1965; Ong *et al*, 1987). Das Durchflusszytometer besteht aus einer Durchflussmesszelle, einer Lichtquelle (meist Laserlicht), Filtern, Photoelektronenvervielfachern (*Photomultiplier tube*, PMT) als Detektoren und Verstärker sowie einem Computer. Zur Detektion der optischen Emissionen einzelner Zellen, werden diese durch ein Schlauchsystem angesaugt und in eine hochpräzise Küvette aus Glas oder Quarz injiziert, sodass die Zellen hintereinander aufgereiht einen Laserstrahl passieren, dessen Streulicht und Fluoreszenzlicht von PMTs erfasst und ausgewertet wird (Dittrich und Göhde, n.d.). Man unterscheidet hierbei zwei Arten von Streulicht: Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FS) ist vor allem von der Größe der Zelle abhängig; große Zellen erzeugen mehr Vorwärtsstreulicht als kleine.

Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SS) wird maßgeblich durch die Granularität der Zelle bestimmt. Die spezifischen Eigenschaften einer Zellpopulation können anschließend in *Dot-Plot*-Diagrammen dargestellt werden (Radcliff und Jaroszeski, 1998). Neben gestreutem Licht können auch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise *green fluorescence protein* (GFP) oder Fluorochrom-markierte Antikörper mit Hilfe des Laserlichts angeregt und gemessen werden (Chattopadhyay *et al*, 2004). Dabei absorbieren GFP oder Fluorochrome Licht des Laserstrahls und emittieren bedingt durch Veränderung des Energieniveaus Licht einer höheren Wellenlänge. Das Fluoreszenzlicht wird mittels Filtern für verschiedene Wellenlängen aufgetrennt und von PMTs detektiert, verstärkt und quantifiziert (Chattopadhyay *et al*, 2004).

So können sog. Marker-positive und Marker-negative Zellen unterschieden und in Subpopulationen eingeteilt werden. Das verwendete Cytomics FC500-Durchflusszytometer verwendet einen blauen 488nm Argonlaser sowie einen roten 638 nm HeNe-Laser; in dem FC500 sind parallele Messungen von 5 unterschiedlichen Fluoreszenzen möglich (Alexander *et al*, 2009; Ong *et al*, 1987; Pierzchalski *et al*, 2011; Radtke, 2014; Traganos, 1984).

2.3.3.3 Untersuchte Oberflächenantigene

In dieser Arbeit wurde zur Kontrolle des mesenchymalen Charakters der MNCs eine durchflusszytometrische Analyse auf die Oberflächenantigene CD105 und CD73 als Marker mesenchymaler Zellen sowie auf die Oberflächenantigene CD14 und CD45 als Marker für Monozyten bzw. Leukozyten durchgeführt.

Zusätzlich wurden 7-AAD, ein organischer Zellfarbstoff als Apoptosemarker, sowie Immunglobulin G1 Fluoresceinisothiocyanat und Phycoerythrin als Isotypenkontrolle bestimmt.

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Marker CD105, CD34 und CD45 immunzytochemisch untersucht (siehe Kapitel 2.7.3).

2.3.4 Herstellung des Kulturmediums

Nachdem mittels durchflusszytometrischer Analyse bestätigt werden konnte, dass die expandierten MNCs zum überwiegenden Teil aus MSCs bestanden (siehe Kapitel 3.1), wurde das Kulturmedium für die verschiedenen Versuchsansätze vorbereitet.

Aufgrund der Zielsetzung dieser Arbeit, die Effekte von Indomethacin und Iloprost auf die osteoblastäre Differenzierung von MSCs zu untersuchen, war es notwendig, ein Kulturmedium zu verwenden, welches an sich die Entwicklung zu reifen Osteoblasten nicht induziert. Als Grundlage diente mit 30% FCS versetztes *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) *low glucose* (PAA, Cölbe Deutschland), welches mit 1% Penicillin-Streptomycin-Gentamycin-Lösung (PSG) versetzt wurde. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen mit 10^{-6} M, 10^{-5} M oder 10^{-4} M Indomethacin mit und ohne Zugabe von 10^{-7} M Iloprost stimuliert. Als Kontrollen dienten Versuchsansätze, die nur mit 10^{-7} M Iloprost oder gänzlich ohne Medikamentenzusatz kultiviert wurden. Vor jedem Versuchsansatz und bei jedem Mediumwechsel wurde das Kulturmedium inklusive der Indomethacin- und Iloprost-Stocklösungen frisch hergestellt (siehe Tabelle 3).

| Zusammensetzung von 150 ml Kulturmedium (Tag 0-10) und 75 ml Kulturmedium (Tag 10-28) | | | |
|---|--------------------------|----------------------|-------------------------|
| Versuch | Indomethacin-Stocklösung | Iloprost-Stocklösung | DMEM + 30% FCS + 1% PSG |
| | Tag 0-10/Tag 10-28 | Tag 0-10/Tag 10-28 | Tag 0-10/Tag 10-28 |
| 0 | | | 150 ml/75 ml |
| 0+Ilo | | 6,76 ml/3,38 ml | 143,24 ml/71,62 ml |
| 10^{-6} M | 0,0861 ml/0,043 ml | | 149,91 ml/74,95 ml |
| 10^{-5} M | 0,861 ml/0,43 ml | | 149,14 ml/74,57 ml |
| 10^{-4} M | 8,61 ml/4,3 ml | | 141,39 ml/70,69 ml |
| 10^{-6} M+Ilo | 0,0861 ml/0,043 ml | 6,76 ml/3,38 ml | 143,15 ml/71,57 ml |
| 10^{-5} M+Ilo | 0,861 ml/0,43 ml | 6,76 ml/3,38 ml | 142,38 ml/71,19 ml |
| 10^{-4} M+Ilo | 8,61 ml/4,3 ml | 6,76 ml/3,38 ml | 134,63 ml/67,31 ml |

Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums

Die verwendeten Konzentrationen von Indomethacin und Iloprost wurden in Übereinstimmung mit zum Zeitpunkt der Studienkonzeption aktuellen Untersuchungen festgelegt:

Chang *et al.* konnten 2007 konzentrationsabhängige osteosuppressive Effekte von Indomethacin auf MSCs in den Konzentrationen 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M nachweisen (Chang *et al.*, 2007).

Das entscheidende Kriterium in der Konzentrationsfindung von Iloprost war der Anstieg des intrazellulären cAMP, der für die meisten Prostaglandin-induzierten Effekte verantwortlich ist (siehe Kapitel 1.3.2.1). Fetalvero *et al.* untersuchten 2006 diesen cAMP-Anstieg unter verschiedenen Iloprost-Konzentrationen. Dabei zeigte sich ab einer Iloprost-Konzentration von 10^{-7} M, dass der cAMP-Anstieg abflacht (Fetalvero *et al.*, 2006, siehe Abbildung 6).

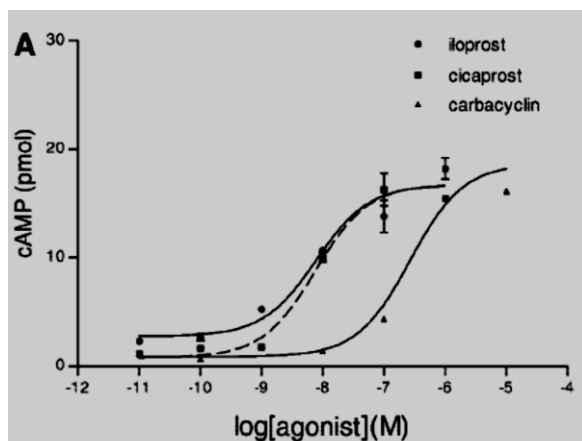


Abbildung 6: Konzentration von intrazellulärem cAMP in Abhängigkeit von der molaren Iloprost-Konzentration (modifiziert nach Fetalvero *et al.* 2005).

2.3.4.1 Herstellung der Indomethacin-Stocklösung

Für diese Arbeit wurde Indomethacin aus Hartkapseln mit einer Wirkstoffmenge von 25 mg pro Kapsel verwendet (Indomet-ratiopharm® 25 mg Hartkapseln, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Neben Indomethacin sind die sonstigen Bestandteile der Hartkapseln Laktose-Monohydrat, Maisstärke, Croscarmellose-Natrium, Gelatine, Magnesiumstearat, Hochdisperses Siliciumdioxid, Talkum, Copovidon, Titandioxid. Um es in Lösung zu bringen wurden die Hartkapseln an der Laborbank geöffnet und das darin enthaltene Pulver in 40 ml DMEM gegeben. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert. Dabei fiel auf, dass die anfangs trübe Lösung durch Filtration aufklarte.

Nach Rücksprache mit dem Institut für organische und makromolekulare Chemie der Universität Düsseldorf konnte ausgeschlossen werden, dass Indomethacinmoleküle im Filter verblieben, da ein Molekül Indomethacin mit einer maximalen Breite von 20 Angström um den Faktor zehn kleiner ist als der Filterporendurchmesser von 0,2 μm . Es ist davon auszugehen, dass die anfängliche Trübung durch langkettige Maisstärkemoleküle verursacht wurde. Das klare Filtrat von 25 mg Indomethacin in 40 ml DMEM wird im Folgenden als Indomethacin-Stocklösung bezeichnet.

2.3.4.2 Berechnung der Indomethacin-Konzentration

Ausgehend vom Molekulargewicht von Indomethacin (358 g/l) wurde errechnet, dass 3,588 mg Indomethacin in 100 ml eine Konzentration von 10^{-4} M ergeben. Für diese Indomethacin-Konzentration werden aus der Stocklösung 5,75 ml pro 100 ml DMEM benötigt, für die beim Versuchsansatz erforderlichen 150 ml Kulturmedium sind dies folglich 8,61 ml der Stocklösung. Die entsprechenden Angaben für die Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-6} M werden in Tabelle 3 dargestellt.

2.3.4.3 Herstellung der Iloprost-Stocklösung

Für diese Arbeit wurde Iloprost (Ilomedin®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aus Ampullen mit 20 µg Iloprost/ml verwendet, welches sich ohne weitere Aufbereitung zur Herstellung der Stocklösung eignete.

2.3.4.4 Berechnung der Iloprost-Konzentration

Ausgehend vom Molekulargewicht von 360,48 g/l ergibt sich eine Molarität von $5,5 \times 10^{-5}$ M pro Ampulle. Nach einer 1:25 Vorverdünnung liegt die Molarität bei $2,22 \times 10^{-6}$ M. Auf 150 ml Kulturmedium wurden für eine Iloprost-Konzentration von 10^{-7} M 6,76 ml der Vorverdünnung benötigt.

2.4 Versuchsansatz

Für das Ansetzen eines Versuches mit jeweils vier 12-well-Platten und zwei T75-Kulturflaschen war pro Ansatz eine Zellzahl von insgesamt $2,59 \times 10^6$ Zellen nötig, um eine Zelldichte von 5000 Zellen/cm² zu erreichen. Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen entsprechend der Zellzahl so in PBS resuspendiert, dass sich eine Zellmenge von 1×10^6 Zellen/ml ergab. Diese Zellsuspension wurde dann entsprechend der gewünschten Zelldichte zum frisch angesetzten Kulturmedium hinzugegeben: 840.000 Zellen in 96 ml Kulturmedium für die 12-well-Platten (210.000 Zellen in 24 ml Kulturmedium pro Platte) und 750.000 Zellen in 40 ml Kulturmedium für die T75-Kulturflaschen (375.000 Zellen in 20 ml Medium pro Flasche), so dass 5.000 Zellen pro cm² ausgesät wurden. Zuzüglich wurden 1×10^6 Zellen für die durchflusszytometrische Analyse resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Verteilung auf die jeweiligen Platten und Kulturflaschen sowie die Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, wobei Wachstum, Adhärenz und eventuelle Kontaminationen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert wurden.

Die Zellen wurden mit Indomethacin in den Konzentrationen 10^{-4} M, 10^{-5} M und 10^{-6} M stimuliert. In weiteren Versuchsansätzen wurde zusätzlich zu jeder Indomethacin-Konzentration 10^{-7} M Iloprost zugegeben (10^{-4} M+Ilo, 10^{-5} M+Ilo, 10^{-6} M+Ilo). Die Kontrollen erfolgten ohne Zugabe von Medikamenten (0) sowie mit Zugabe von 10^{-7} M Iloprost (0+Ilo).

Alle Versuche wurden mit Zellen von jeweils drei verschiedenen Spendern für jede Medikamentenkonzentration und –kombination durchgeführt (siehe Tabelle 1: Zuordnung von Indomethacin-Konzentration und Iloprost-Zugabe (10^{-7} M) zur in dieser Konzentration kultivierten Zellreihe des Spenders.). Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen wurden die photometrischen Assays im Vierfachansatz durchgeführt. Kinetikpunkte zur Durchführung der Enzymassays und der Immunzytochemie fanden an Tag 10 (Kinetikpunkt 1) und 28 (Kinetikpunkt 2) statt.

An Kinetikpunkt 1 wurden zwei 12-*well*-Platten (eine für die photometrischen Assays und eine für die Immunzytochemie) und eine T75-Kulturflasche (für die RT-PCR) ausgewertet (siehe Abbildung 3). Die 12-*well*-Platte für die photometrischen Assays wurde zweimal mit PBS gewaschen, danach trocken abgesaugt, mit Parafilm verklebt und bei -80°C gelagert. Die 12-*well*-Platte für die Immunzytochemie wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 20 min in 4% phosphatgepuffertem Formaldehyd (Roti®-Histofix 4% säurefrei, Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert, zweimal mit *aqua dest.* gewaschen und bei 4°C gelagert. Die T75-Kulturflasche wurde zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und mit 10 ml 10% Trypsin-EDTA trypsinisiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 350 μl RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die verbleibenden Zellen der beiden 12-*well*-Platten und die T75-Kulturflasche wurden weiter kultiviert.

2.5 Versuchsende

Der zweite Kinetikpunkt und somit das Versuchsende fand nach einer Kulturdauer von 28 Tagen statt. Die Konservierungs- und Lagerungsschritte entsprechen denen von Kinetikpunkt 1 (s.o.).

2.6 Zellproliferation

In dieser Arbeit wurde ein Laktatdehydrogenase (LDH)-basierter Zytotoxizitäts-Assay (CytoTox®96, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet, um die Zellzahl der MSCs mit und ohne Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Indomethacin und Iloprost an Tag 10 und 28 zu messen. LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das von beschädigten Zellen freigesetzt wird (Butler *et al*, 2014). An Tag 10 und 28 wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie auf 12-*well*-Platten bei -80°C eingefroren wurden.

Zur Lyse der Zellen wurden diese aufgetaut, in vier der *wells* wurden 200 μ l PBS hinzugefügt und die Zellen auf dem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 330 Upm/RT/30 sec inkubiert. Die übrigen *wells* wurden für den ALP- und BCA-Assay verwendet (siehe Kapitel 2.7). Anschließend wurde das Lysat bei 1800 Upm/RT/4 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden in Doppelbestimmung jeweils 5 μ l zu 45 μ l PBS/*well* auf einer 96-*well*-Platte gegeben. Diese 1:10-Verdünnung lag in Vortests im messtechnisch genauen Extinktionsbereich (0,15-1,5) des Spektralphotometers (Cary 50 Bio, Varian, Darmstadt, Deutschland). Sofern in den Vortests die Extinktion oberhalb des Messbereichs lag, wurde eine Vorverdünnung angelegt. Eine Extinktion unterhalb des Messbereichs konnte nicht beobachtet werden.

Anschließend wurden 50 μ l des Substrats zugegeben, was zu einer Umwandlung von Tetrazoliumsalz in ein rotes Formazanprodukt führt, voraussetzend, dass die Extinktion dieser Farbreaktion proportional zur Menge der freigesetzten LDH und demnach zur Anzahl der lysierten Zellen ist (Promega Corp., 2012).

Nach 30 min wurde der Assay durch Zugabe von 50 μ l H₂SO₄/*well* gestoppt und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

Die Zellzahl wurde anhand einer Standardkurve auf Grundlage der LDH-Menge einer definierten Zahl von Knochenmarkzellen berechnet. Dazu wurde der Extinktionswert zum Start der Reaktion (t_0) vom Extinktionswert zum Ende der Reaktion (t_{30}) subtrahiert, ein Mittelwert aus den bereinigten Extinktionswerten ($t_{30}-t_0$) der beiden *wells* der Doppelbestimmung der 96-*well*-Platte gebildet, dieser durch die Steigung der Standardkurve geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Abschließend wurde aus den Zellzahlen der 4 *wells* der 12-*well*-Platte ein Mittelwert gebildet.

2.7 Zelldifferenzierung

Zum Nachweis der Zelldifferenzierung wurden in dieser Arbeit ein ALP-Assay, eine immunzytochemische Analyse und eine RT-PCR zur Überprüfung der Expression osteoblastärer Marker durchgeführt.

2.7.1 ALP-Assay

Die Alkalische Phosphatase, knochenspezifisch auch Ostase genannt, ist ein Enzym, das Phosphatgruppen von Proteinen, Nukleotiden und Alkaloiden entfernt.

Im Menschen unterscheidet man 15 verschiedene Isoenzyme, von denen vier aus unterschiedlichen Geweben stammen (Dünndarm-ALP, Plazenta-ALP, Keimzell-ALP und Gewebe-unspezifische ALP) (Iino, 1995). Letztere wird je nach Gewebe unterschiedlich posttranslational glykolysiert, wodurch weitere Isoenzyme entstehen (Leber-ALP, Knochen-ALP, Nieren-ALP). Ein hoher Spiegel alkalischer Phosphatase ist *in vitro* mit früher osteoblastärer Differenzierung assoziiert (Hoemann *et al*, 2009).

Um den ALP-Gehalt in den Zellkulturen zu bestimmen, wurde ein Assay verwendet, der auf der Dephosphorylierung von p-Nitrophenolphosphat zu p-Nitrophenol basiert (*Enzymatic assay of Alkaline Phosphatase*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

An Versuchstag 10 und 28 wurden die Zellen durch Zugabe von *aqua dest.* in vier *wells* einer 12-*well*-Platte lysiert, auf dem Thermomixer bei 300 Upm/RT/30 sec inkubiert und bei 1800 Upm/RT/4 min zentrifugiert. In Doppelbestimmung wurden 5 µl des Überstands zu 45 µl *aqua dest.* auf einer 96-*well*-Platte gegeben.

Analog zum CytoTox®96-Assay wurden Vortests durchgeführt, um eine Vorverdünnung für die unterschiedlichen Spender und Medikamentenkonzentrationen zu finden, deren Extinktion im messtechnisch genauen Extinktionsbereich (0,15-1,5) des Spektralphotometers (Cary 50 Bio, Varian, Darmstadt, Deutschland) lag. Anschließend wurden 50 µl Substrat (p-Nitrophenolatphosphat) pro *well* hinzugegeben, wodurch in einer von der ALP katalysierten Reaktion das chromophore p-Nitrophenolat-Ion entsteht, dessen Menge über die Zeit durch Extinktionsmessungen alle 10 min bis zu einer Stunde bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert wurde (Sigma-Aldrich, n.d.).

Die ALP-Aktivität wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet, die durch eine Enzymlösung des Herstellers mit definierter ALP-Aktivität pro Volumen (Sigma P6774, 50 Units/µl) kalibriert wurde. Hierzu wurde der Extinktionswert zum Start der Reaktion (t_0) vom Extinktionswert, der zuletzt im messtechnisch genauen Bereich lag (t_x), subtrahiert. Ein Mittelwert der Extinktionen der Doppelbestimmungen wurde gebildet und dieser durch die Steigung der Standardkurve geteilt. Die so berechnete Enzymaktivität wurde durch die Dauer der Extinktionsmessung in Minuten geteilt, auf eine Stunde hochgerechnet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Abschließend wurde aus den Ergebnissen der 4 *wells* der 12-*well*-Platte ein Mittelwert für die ALP-Aktivität gebildet. Die spezifische Enzymaktivität wurde berechnet, indem die gemessene ALP-Aktivität ins Verhältnis zur Gesamtproteinmenge des Überstandes gesetzt wurde:

$$\text{Spezifische ALP-Aktivität} = \frac{\text{ALP-Aktivität } [\mu\text{Units}]}{\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}] * \text{Zeit } [\text{h}]}$$

2.7.2 BCA-Assay

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit einem Bicinchoninsäure-Assay (BCA, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) gemessen. In diesem Assay werden zweiwertige Kupfer-Ionen aus kupfersulfathaltigem *BCA-Reagent B* durch Protein zu einwertigen Kupfer-Ionen reduziert, welche mit Bicinchoninsäure aus *BCA-Reagent A* einen violetten wasserlöslichen Chelatkomplex bilden, dessen Extinktion bei 562 nm gemessen werden kann (Pierce Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Dazu wurden 200 µl PBS in vier *wells* der 12-*well*-Platten gegeben, diese bei 300 Upm/RT/30 sec auf dem Thermomixer inkubiert und anschließend bei 1800 Upm/RT/4 min zentrifugiert. An Tag 10 wurden 30 µl Lysat in 120 µl PBS/*well* auf einer 96-*well*-Platte gegeben, an Tag 28 15 µl Lysat in 135 µl PBS/*well*, um im messtechnisch genauen Extinktionsbereich (0,15-1,5) des Spektralphotometers (Cary 50 Bio, Varian, Darmstadt, Deutschland) zu liegen. Diese 1:5 bzw. 1:10 Verdünnungen wurden in Vortests ermittelt. In Doppelbestimmung wurden die Platten bei 37°C für 120 min inkubiert, auf RT abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm im Spektralphotometer gemessen.

Die Proteinkonzentration des Lysats wurde durch Vergleich mit der Extinktion einer Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) mit bekannter Konzentration (2000 µg/ml BSA verdünnt auf 200; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625 µg/ml) bestimmt, die ebenfalls in Doppelbestimmung auf der 96-*well*-Platte angelegt wurde.

2.7.3 Immunzytochemische Nachweisverfahren

Die immunzytochemischen Nachweisverfahren wurden durchgeführt, um spezifische Marker der osteoblastären Differenzierung zu detektieren und um das Vorhandensein oder Fehlen typischer Zellmarker für multipotente Knochenmarkstammzellen (CD105+, CD34-, CD45-) zu überprüfen. Als Osteoblastenmarker dienten Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), Alkalische Phosphatase (ALP) und *runx-related transcription factor 2*-Protein (Runx2); Twist diente als Marker, der die osteoblastäre Differenzierung hemmt.

2.7.3.1 Untersuchte Marker

Das tripelhelikale Strukturprotein Col1 ist die eine wichtige organische Komponente im Knochen und wird von reifen Osteoblasten exprimiert. Sein Vorhandensein zeigt *in vitro* osteoblastäre Aktivität an und es gibt Hinweise, dass Col1 selbst eine Differenzierung von Knochenmarkzellen zu Osteoblasten induziert (Mizuno *et al*, 2000).

OC ist ein nicht-kollagener Hauptbestandteil des Knochens und macht ca. 2% seiner Masse aus. Es wird allein von Osteoblasten sezerniert, hemmt die Knochenmineralisation und bindet Hydroxylapatit und Kalzium (Wada und Kamiya, 2006). Der an *DNA*-bindende Transkriptionsfaktor Runx2 ist der zentrale Transkriptionsfaktor der osteoblastären Differenzierung und ist essenziell für die prä- und postnatale Skelettentwicklung (Komori, 2006; Lee *et al*, 2000; Takarada *et al*, 2013). Twist, ein *Helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktor, ist an der Entwicklung mesenchymalen Gewebes, einschließlich des Knochengewebes, während der Embryonalperiode beteiligt (Miraoui und Marie, 2010).

Im Gegensatz zu Runx2 ist eine hohe Expression von Twist mit einer verminderten Expression osteoblastärer Marker wie OC, ALP und auch Runx2 assoziiert und begünstigt die Differenzierung zu Adipozyten (Isenmann *et al*, 2009; Komaki *et al*, 2007).

2.7.3.2 Durchführung

An Tag 10 und 28 wurden die Zellen auf einer 12-well-Platte zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min in 0,3% H₂O₂ inkubiert um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu eliminieren. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Primärantikörpern in Verdünnungen von 1:20 für für CD34 und CD105 bis 1:500 für Runx2 bei 4°C für 12 h inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

| Antikörper | CD34 | CD 45 | CD 105 | Col 1 | Runx2 | Twist | Osteocalcin |
|---------------------------|----------|----------------|--------|------------|------------|------------|-------------|
| Klon | QBEnd/10 | 2B11 PD7 26 | SN6h | polyklonal | polyklonal | polyklonal | polyklonal |
| Spezies | Mouse | Mouse | Mouse | Mouse | Rat | Rabbit | Goat |
| Hersteller | DAKO | DAKO | DAKO | Chemicon | R&D | Santa Cruz | Santa Cruz |
| Arbeitsverdünnung in PBST | 1:20 | 1:100 | 1:20 | 1:100 | 1:500 | 1:200 | 1:200 |

Tabelle 4: Klon, Spezies, Hersteller und Arbeitsverdünnung der Primärantikörper.

Anschließend wurden biotinylierte Sekundärantikörper mit Spezifität gegen den Primärantikörper für 45 min in einer Verdünnung von 1:200 mit PBS + Triton x-100 (PBST) hinzugegeben. Durch erneutes Waschen mit PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt und die Zellen mit *Avidin-Biotin-Complex* (ABC, Biozol, Eching, Germany) mit *horseradish-peroxidase* (HRP) als gebundenem Enzym für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert,

so dass sich aufgrund der hohen Affinität von Avidin für Biotin Komplexe aus enzymmarkiertem Avidin-Biotin-Complex und biotinylierten Sekundärantikörpern bilden konnten. Als Negativkontrollen wurden Sekundärantikörper ohne vorhergehende Inkubation mit Primärantikörpern hinzugegeben. Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Bindung wurde nach einem weiteren Waschschrift mit PBS das Substrat Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt, welches von der HRP zu einem braunen Endprodukt umgesetzt wird (Malatesta *et al*, 2013). Die Farbreaktion wurde nach 2 min mittels Stopplösung beendet und die Zellen in Glycerin-Gelatine gelagert.

Zur Färbung der alkalischen Phosphatase wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS für 45 min/RT mit *Vector blue* (Biozol, Eching, Deutschland) inkubiert, anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen und ebenfalls in Glycerin-Gelatine gelagert.

Für die Auswertung wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem verwendet: Mittels Lichtmikroskopie wurde der Anteil von gefärbten Zellen geschätzt und in vier Gruppen von nicht gefärbt (-) bis stark gefärbt (+++) unterteilt (- = keine gefärbten Zellen, + = bis zu 50% gefärbte Zellen, ++ = 50-75%, +++ = <75%).

2.8 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mittels RT-PCR werden Ribonukleinsäuren (*RNA*) in komplementäre *DNA* (*cDNA*) umgeschrieben und *in vitro* amplifiziert (Baltimore, 1970; Mullis *et al*, 1992; Telesnitsky und Goff, 1997; Temin und Mizutani, 1992). Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit diente die RT-PCR der Amplifikation der *RNA* für OC, Col1, CD34, CD45, CD105, Runx2 und ALP.

2.8.1 Ribonukleinsäure-Isolation

Die zu jedem Kinetikpunkt (Tag 10 und 28) in 1,5 ml PBS eingefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ml TRI® *reagent* (*total RNA isolation reagent*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), basierend auf Phenolen, versetzt. Anschließend wurden zur Einleitung einer Phasenreaktion 200 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Schütteln und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 1800 Upm/RT/5 min.

Im Reaktionsgefäß zeigten sich unten eine rötliche Phenol-Chloroform-Phase, darüber eine Interphase aus *DNA* und oben eine wässrige *RNA*-Phase (Sigma-Aldrich, n.d.). Letztere wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß umpipettiert und mit 500 µl Isopropanol zur *RNA*-Ausfällung versetzt. Nun erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min mit anschließender Zentrifugation bei 1800 Upm/RT/5 min. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 75% Ethanol wiederholt gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde das Reaktionsgefäß 10 min offen gelagert, dann die *mRNA* abschließend mit 15-50 µl sterilem *RNAse*-freiem Wasser gelöst und bei -80°C eingefroren.

2.8.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, welches *RNA* in komplementäre *DNA* (*cDNA*) umschreibt. Die *cDNA* kann anschließend mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden (Baltimore, 1970; Mullis *et al*, 1992; Telesnitsky und Goff, 1997; Temin und Mizutani, 1992). Zur Transkription wurde die isolierte *RNA* aufgetaut und zur Inaktivierung der Ribonuklease mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser verdünnt (Summers, 1970) und anschließend nach Herstellerangaben (One-Step-RT-PCR Kit®, Qiagen, Hilden, Deutschland) ein RT-PCR-Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 5), der alle zur RT-PCR notwendigen Komponenten enthielt, ausgenommen die zu untersuchende *RNA*. Nun wurde die isolierte *RNA* dem Mastermix zugefügt und in bis zu 30 Zyklen im *Thermocycler* (Mastercycler® Pro PCR, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben die komplementäre *DNA* gewonnen, welche entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C zwischengelagert wurde.

| | |
|-----------------------------|--------|
| <i>RNA</i> sin 1:4 | 12 µl |
| Enzy-Mix | 48 µl |
| dNTP-Mix 10 mM | 48 µl |
| 5 x RT-PCR-Puffer | 240 µl |
| 5x Q-Solution | 240 µl |
| <i>RNAse</i> -freies Wasser | 600 µl |

Tabelle 5: Mastermix (aus One-Step-RT-PCR Kit®, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 4 Versuchsansätze für die 8 zu untersuchenden Marker alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), *Runt-related transcription factor 2* (Runx2). *Cluster of differentiation 34* (CD34), CD45, CD105, und *Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase* (GAPDH).

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ermöglicht die Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten (*cDNA* oder *DNA*) *in vitro*. Die Amplifikation verläuft in sich wiederholenden Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation (Mullis *et al*, 1992). Zur Denaturierung wird die doppelsträngige *DNA* auf 90°C erhitzt, dabei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen und die beiden Stränge trennen sich auf. Im Anschluss erfolgt eine Abkühlung auf 65°C, damit sich die 17-21 Basenpaare langen Primer (kurze, komplementäre Oligonukleotid-Sequenzen, siehe Tabelle 6) an die aufgespaltenen *DNA*-Stränge anlagern können.

Zur Elongation werden *DNA*-Polymerase und Desoxyribunukleotide zugeführt, sodass die *DNA*-Polymerase ab der Primersequenz komplementäre Nukleinsäuresequenzen synthetisieren kann (Mullis *et al*, 1992). Dieser Zyklus wird bis zu 30 Mal wiederholt, wobei die komplementär synthetisierten *cDNA*-Stränge als Vorlage zur Replikation in den darauf folgenden Zyklen dienen. Entscheidend für den Gesamtprozess ist, eine hitzestabile *DNA*-Polymerase zu verwenden, die aus dem thermophilen Bakterium *thermus aquaticus* gewonnen wird (Saiki *et al*, 1988). Nach Abschluss der PCR-Zyklen wird ein Teil der entstandenen *DNA* auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert. Bei diesem Verfahren wird eine Spannung an eine Platte mit Agarosegel angebracht und die *DNA* am Minuspol auf diese Platte aufgetragen. Kürzere Fragmente wandern schneller in Richtung Pluspol als längere (Adkins und Burmeister, 1996). Anschließend wird die Agarosegelplatte in Ethidiumbromid gebadet. Dieser rote Phenanthridin-Farbstoff interkaliert in Nukleinsäuren, verändert dabei sein Absorptionsspektrum und steigert die Intensität der Fluoreszenz-Emission, so dass die *DNA*-Banden unter UV-Licht sichtbar werden (Huang und Fu, 2005; Le Pecq und Paoletti, 1966; Waring, 1965). Die Länge in Basenpaaren wird mit Hilfe einer parallel zur Probe verlaufenden *DNA*-Leiter mit definierten Fragmenten unterschiedlicher Größe ermittelt. Als Kontrolle läuft auf jedem Agarosegel eine Spur mit *aqua bidestillata* mit. Um die korrekte Durchführung der RT-PCR zu überprüfen, wird auch die *DNA*, die für das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodiert, amplifiziert. Die mitochondriale *RNA*, die dieses Glykolyse-Enzyms kodiert, ist in jeder stoffwechselaktiven Körperzelle vorhanden, weshalb man GAPDH auch als sogenanntes *housekeeping gene* bezeichnet (Li *et al*, 2014; Teng *et al*, 2012).

| Abkürzung | 5'forward primer | 3'reverse primer | Basenpaare (bp) |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| OC | agt cca gca aag gtg cag c | ggc cgt aga agc gcc gat | 209 |
| ALP | gct tca gaa gct caa cac ca | cgt tgt ctg agt acc agt cc | 454 |
| Col 1 | tgt cca ctc ttc tag ttc ct | ttg ggt cat ttc cac atg c | 736 |
| Runx2 | acg aca acc gca cca tgg t | cgg ctc tga gtg agg gat | 452 |
| CD 34 | cat cac aga aac gac agt caa | ctg cct tga tgt cac tta gg | 265 |
| CD 45 | ctg aag caa agg aac agg ct | gg agg aca tct tga ggt cat | 590 |
| CD 105 | ggc cgc acg ctc gag tg | aca tga gca gct ccg ggc | 498 |
| GADPH | ctc aag atc atc agc aat | gat ggt aca tga caa ggt gc | 755 |

Tabelle 6: Auflistung der für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Primer für die Marker alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), *Cluster of differentiation 34* (CD34), CD45, CD105, und *glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH). Herstellerangaben im Anhang ersichtlich.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse aus LDH- und ALP-Assay erfolgte in einem allgemeinen linearen Modell durch eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Konfidenzintervall von 95%. Hierbei wurden im einfaktoriellen Modell die Mittelwertunterschiede der Zellproliferation als absolute Zellzahl (CytoTox96®-Assay) sowie der Zelldifferenzierung als ALP-Aktivität pro Menge Protein pro Stunde (ALP-Assay) in Abhängigkeit der Indomethacin- und Iloprostkonzentration für die Versuchstage 10 und 28 getrennt berechnet. Zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte am betrachteten Versuchstag (z.B. verschiedene Indomethacin-Konzentrationen untereinander, mit der Kontrolle oder verschiedene Indomethacin-Konzentrationen mit entsprechenden Indomethacin-Konzentrationen plus Iloprost) wurde ein t-Test für abhängige Variablen (Paardifferenztest, *paired t-test*) als *posthoc*-Verfahren durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant bezeichnet. Eine Signifikanzanalyse erfolgte nur für die Versuchsergebnisse der Spender, die mehr als einen Versuchsansatz aufwiesen. Eine Analyse innerhalb eines Versuchsansatzes zwischen Tag 10 und 28 wurde nicht durchgeführt.

Als Statistikprogramme kam IBM® *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) in den Versionen 17.0 und 21.0 zum Einsatz.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde *in vitro* der Einfluss der Medikamente Indomethacin in den Konzentrationen 10^{-4} M, 10^{-5} M und 10^{-6} M und Iloprost in der Konzentration 10^{-7} M sowie einer Kombination von beiden auf die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stromazellen (MSCs) aus humanem Knochenmark untersucht. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde die Zellproliferation mittels *CytoTox96®* Assay gemessen und die Zelldifferenzierung von MSCs zu Osteoblasten durch die Bestimmung der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität quantifiziert. Die Expression der osteoblastären Marker Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), Alkalische Phosphatase (ALP), der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Twist* sowie der Oberflächenantigene CD34, CD45 und CD105 wurde auf Proteinebene mittels einer immunzytochemischen Analyse und auf genetischer Ebene mittels RT-PCR untersucht.

Die ermittelten Ergebnisse der Zellzahlbestimmung und der spezifischen ALP-Aktivität wurden intraindividuell verglichen und statistisch ausgewertet. Interindividuelle Vergleiche wurden bewusst nicht durchgeführt, da Einflussfaktoren wie Spenderalter und –geschlecht die Proliferation und osteoblastäre Differenzierung beeinflussen (Stolzing *et al*, 2008; Wagner *et al*, 2009) und mögliche Effekte nicht auf die Medikamentenapplikation zurückzuführen wären.

3.1 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Bestätigung des mesenchymalen Charakters der aus Knochenmark isolierten und expandierten mononukleären Zellen (MNCs), wurde vor jedem Versuchsansatz eine durchflusszytometrische Analyse mit den Oberflächenantigenen CD105, CD73, CD45 und CD14 durchgeführt. 7-Aminactinomycin (7-AAD) diente als Apoptosemarker und Immunglobulin G1 Fluoresceinisothiocyanat (IgG 1 FITC) sowie Phycoerythrin (IgG 1 PE) als Isotypenkontrolle. Damit entsprachen die Zellkulturen nicht den Kriterien zur Definition mesenchymaler Stromazellen der *International Society of Cellular Therapy* (ISCT), welche die Expression der Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR voraussetzen (Dominici *et al*, 2006).

Exemplarisch wird in Abbildung 7 die durchflusszytometrische Charakterisierung der MSCs aus dem Knochenmark von Spender A dargestellt. 98,7% der Zellen exprimierten CD105, 99,7% exprimierten CD73 und 73,5% zeigten keine Expression von CD45 und CD14. Der Anteil apoptotischer Zellen lag bei 4,3%. In den Isotypenkontrollen IgG 1 FITC und IgG 1 PE zeigten sich keine relevanten Kreuzreaktionen. Diese Auswertungen legten nahe, dass die isolierten und expandierten MNCs zum überwiegenden Teil aus MSCs bestanden. Es lag allerdings auch eine CD45-positive Subpopulation vor.

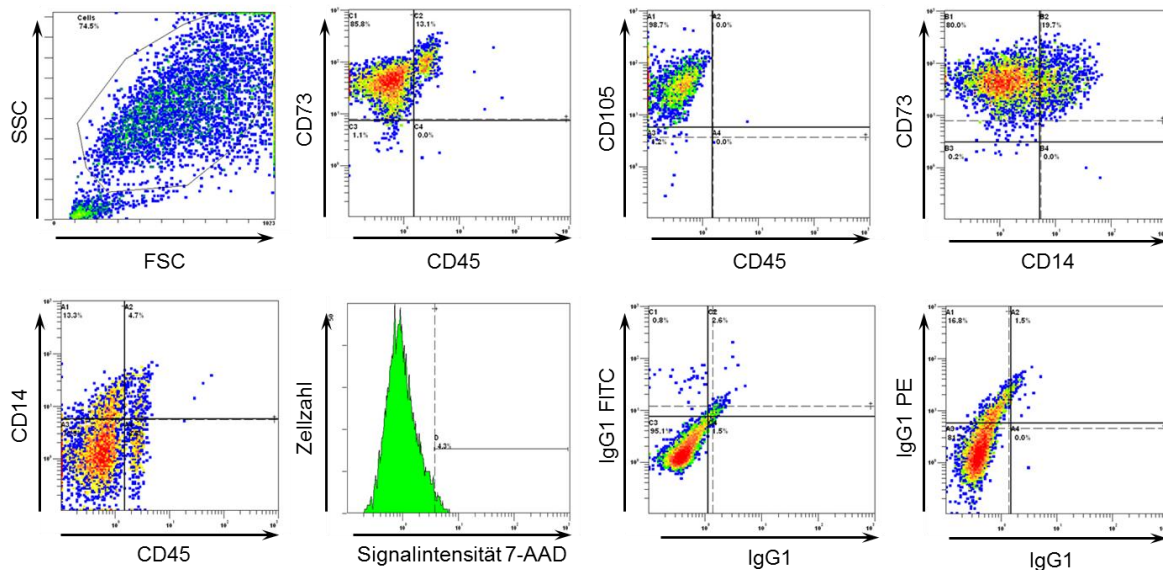


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark von Spender A nach Isolation und Expansion. SSC = *sideward scatter*, FSC = *forward scatter*, CD = *cluster of differentiation*, 7-AAD = 7-Aminactinomycin, IgG1 = Immunglobulin G1, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin.

3.2 Proliferationsverhalten von MSCs ohne Medikamentenapplikation

Um die Proliferation von MSCs unter Kulturbedingungen ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost zu quantifizieren, wurden MSCs aus Knochenmark der Spender A (26 Jahre, männlich, Passage 1), B (25 Jahre, weiblich, Passage 2) und H (17 Jahre, männlich, Passage 1) kultiviert. Alle vier Tage bis zu Tag 28 wurde von jeder Zellreihe eine 12-well-Platte aus der Kultivierung entfernt um eine Zellzahlbestimmung mittels CytoTox96® Assay durchzuführen (siehe Abbildung 8).

Trotz ähnlichem Spenderalter und ähnlicher Anzahl der Zellpassagen, zeigten sich während der Kultivierung Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den MSCs der einzelnen Spender.

Die durchschnittliche Proliferationsrate der MSCs betrug von Tag vier bis Tag 20 1,407 für Spender A, 1,403 für Spender B und 1,417 für Spender H (Formel: $p = (z(t_{20})/z(t_4))^{1/n}$, wobei p für Proliferationsrate, z für die Zellzahl zum Zeitpunkt t (Versuchstag) und n für die Anzahl an Intervallen zwischen den Messungen steht). Die Zellzahlbestimmung zeigte, dass die MSCs aus dem Knochenmark der Spender A, B und H unter Kulturbedingungen ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost bis zum Tag 20 proliferierten. Ab Tag 20 stagnierte die Zellzahl (Spender B) beziehungsweise nahm ab (Spender A und H).

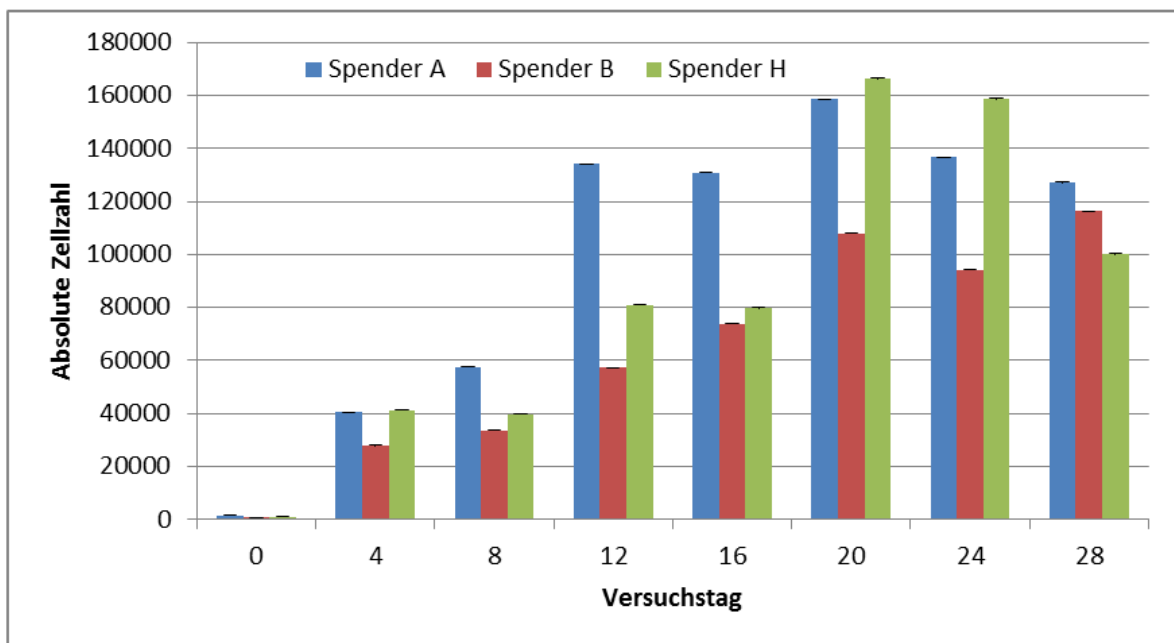


Abbildung 8: Absolute Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkulturen Spender A, B und H im zeitlichen Verlauf. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

3.3 Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Proliferation von MSCs

Die Zellzahl wurde, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, an Tag 10 und 28 mittels *CytoTox96®*-Assay bestimmt. Die gemittelten Zellzahlen aus vier *wells* pro Versuchsansatz sind in Tabelle 7 für die verschiedenen Spender dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen keine eindeutige Tendenz, ob eine steigende Indomethacinkonzentration zu einer Suppression der Proliferation an Tag 10 und 28 im Vergleich zur Kontrolle führt. Die Ergebnisse von Spender A und D lassen eine dosisabhängige Suppression der Proliferation an Tag 28 vermuten (siehe Abbildung 9 und Abbildung 12).

Verglichen mit der Kontrolle 0, wurden für Spender A nach Zugabe von Indomethacin allerdings höhere Zellzahlen gemessen. Proliferative Effekte durch alleinige Zugabe von Iloprost (0+Ilo) im Vergleich zur Kontrolle 0 konnten weder für die Zellen von Spender A, noch von Spender B an Tag 10 und 28 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). In Kombination mit Indomethacin förderte Iloprost die Proliferation der MSCs an beiden Zeitpunkten (Spender B). Zudem ließ sich unter der Kombination von Indomethacin und Iloprost eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Zellzahl an Tag 10 bei Spender A und B und an Tag 28 bei Spender B und C (siehe Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 11) feststellen. Dennoch sind die Ergebnisse im Vergleich zwischen den Spendern uneinheitlich.

In den Versuchsansätzen von Spender E, F und G mit jeweils nur einer untersuchten Konzentration/Kombination stieg die Zellzahl von Tag 10 zu Tag 28 an (Abbildung 13).

Bei mehr als einem Versuchsansatz pro Spender wurden die Ergebnisse verglichen und auf statistische Signifikanz mittels abhängigem t-Test geprüft.

| | Versuchsansatz | 0 | 10^{-6} M | 10^{-5} M | 10^{-4} M | 0+Ilo | 10^{-6} M+Ilo | 10^{-5} M+Ilo | 10^{-4} M+Ilo |
|-----------|----------------|--------|-------------|-------------|-------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Spender A | Tag 10 | 63211 | 41055 | | 58624 | 60529 | 48598 | 41017 | 25648 |
| | Tag 28 | 175799 | 284834 | | 242641 | 170713 | 153190 | 152021 | 162944 |
| Spender B | Tag 10 | 47322 | | 38873 | | 79376 | 157067 | 133952 | 103377 |
| | Tag 28 | 212075 | | 196567 | | 160088 | 396379 | 384050 | 310175 |
| Spender C | Tag 10 | 5011 | | | | | 6403 | 6332 | 8592 |
| | Tag 28 | 29339 | | | | | 38486 | 35867 | 18135 |
| Spender D | Tag 10 | | | 76708 | 75704 | | | | |
| | Tag 28 | | | 326871 | 175579 | | | | |
| Spender E | Tag 10 | | | 48048 | | | | | |
| | Tag 28 | | | 246709 | | | | | |
| Spender F | Tag 10 | | 63853 | | | | | | |
| | Tag 28 | | 212823 | | | | | | |
| Spender G | Tag 10 | | | | | 20288 | | | |
| | Tag 28 | | | | | 36402 | | | |

Tabelle 7: Gemittelte Zellzahlen der Versuchsansätze der Spender A-G an Tag 10 und 28. Die Ergebnisse des Versuchsansatzes Spender B mit 10^{-4} M Indomethacin flossen bei extrem stark abweichenden Zellzahlen nicht in die Auswertung mit ein.

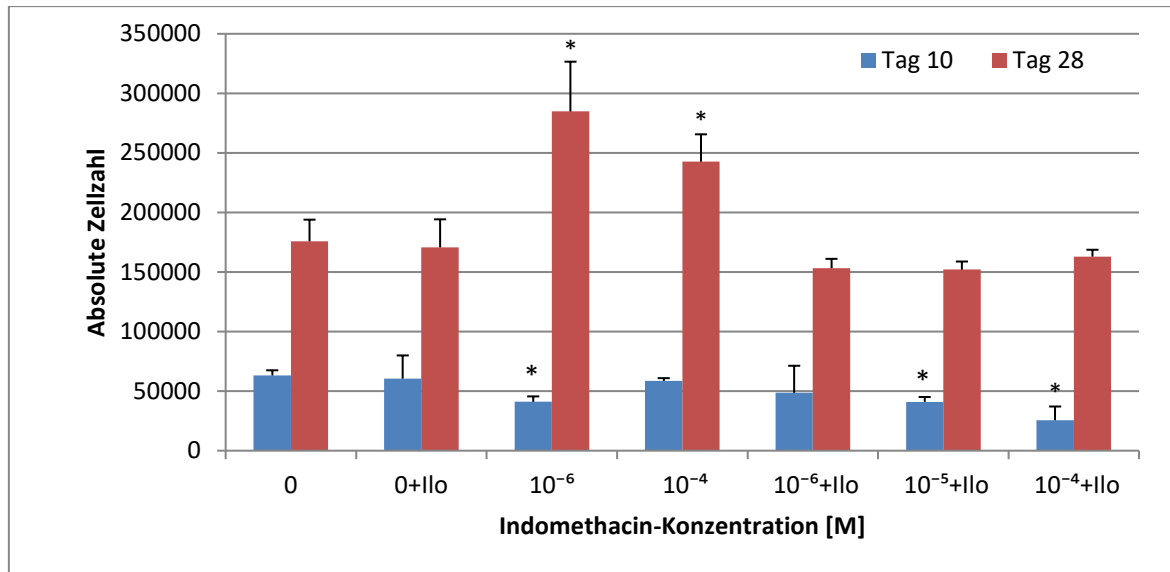


Abbildung 9: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0), alleinige Zugabe von Iloprost (0+Ilo) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Iloprost (Ilo). * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|--|---------------|---------------|
| 0 vs. 0+Ilo | 0,764 | 0,744 |
| 0 vs. 10 ⁻⁶ | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ | 0,608 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,112 | 0,155 |
| 0 vs. 10 ⁻⁵ +Ilo | <0,05 | 0,136 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | <0,05 | 0,412 |
| 10 ⁻⁶ vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,401 | <0,05 |
| 10 ⁻⁴ vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | <0,05 | <0,05 |

Tabelle 8: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle (0), im Vergleich der Kontrolle (0) mit und ohne Zugabe von Iloprost (0+Ilo), sowie im Vergleich gleicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost. Spender A.

| Spender A | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
|----------------------------|---------------|-------------|-------|-------|---------------|-------------|--------|-------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 65847 | | | | 173288 | | |
| | | 56870 | | | | 180225 | | |
| | | 65930 | | | | 152892 | | |
| | | 64197 | 63211 | 4302 | | 196792 | 175799 | 18178 |
| | | | | | | | | |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 89542 | | | | 200500 | | |
| | | 50708 | | | | 176250 | | |
| | | 53308 | | | | 145400 | | |
| | | 48558 | 60529 | 19439 | | 160700 | 170713 | 23515 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁶ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 47508 | | | | 311488 | | |
| | | 37943 | | | | 241225 | | |
| | | 37880 | | | | 258125 | | |
| | | 40890 | 41055 | 4525 | | 328500 | 284834 | 41762 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁴ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 61968 | | | | 253934 | | |
| | | 58104 | | | | 258419 | | |
| | | 56826 | | | | 249600 | | |
| | | 57600 | 58624 | 2290 | | 208609 | 242641 | 22971 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁶+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 82627 | | | | 156758 | | |
| | | 38128 | | | | 153942 | | |
| | | 36948 | | | | 141975 | | |
| | | 36687 | 48598 | 22695 | | 160083 | 153190 | 7887 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁵+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 36680 | | | | 146467 | | |
| | | 46490 | | | | 147525 | | |
| | | 40393 | | | | 161350 | | |
| | | 40503 | 41017 | 4059 | | 152742 | 152021 | 6797 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁴+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 32490 | | | | 159258 | | |
| | | 24498 | | | | 163392 | | |
| | | 9978 | | | | 158217 | | |
| | | 35623 | 25648 | 11448 | | 170908 | 162944 | 5761 |

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender A an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

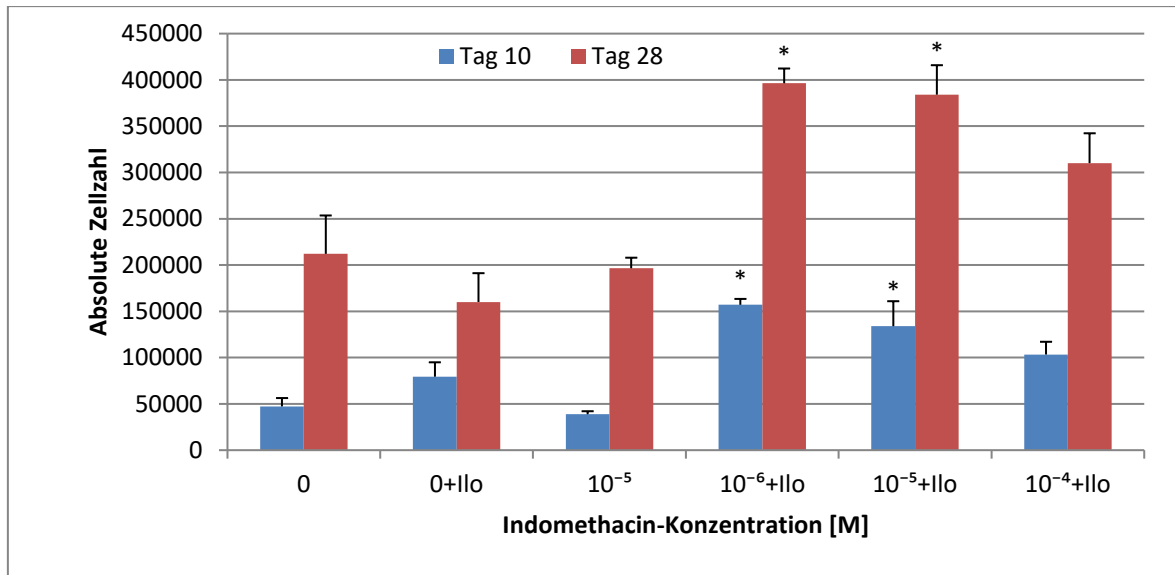


Abbildung 10: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Iloprost. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). Im Versuchsansatz mit 10^{-6} M Indomethacin der MSCs von Spender B stellte sich nachträglich ein Fehler in der Konzentrationsberechnung heraus, sodass dieser Versuchsansatz nicht ausgewertet werden konnte.

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| 0 vs. 0+Ilo | 0,1 | 0,05 |
| 0 vs. 10^{-5} | <0,05 | 0,538 |
| 0 vs. 10^{-6} +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10^{-5} +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10^{-4} +Ilo | 0,054 | <0,05 |
| 10^{-6} vs. 10^{-6} +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 10^{-5} vs. 10^{-5} +Ilo | <0,05 | <0,05 |

Tabelle 10: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle (0), sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender B.

| Spender B | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
|----------------------------|---------------|-------------|--------|-------|---------------|-------------|--------|-------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 59525 | | | | 167150 | | |
| | | 46775 | | | | 249375 | | |
| | | 45063 | | | | 186600 | | |
| | | 37925 | 47322 | 8993 | | 245175 | 212075 | 41449 |
| | | | | | | | | |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 87260 | | | | 149500 | | |
| | | 59107 | | | | 146692 | | |
| | | 76200 | | | | 137967 | | |
| | | 94937 | 79376 | 15548 | | 206192 | 160088 | 31126 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁵ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 31025 | | | | 175150 | | |
| | | 41067 | | | | 211017 | | |
| | | 37350 | | | | 205867 | | |
| | | 46050 | 38873 | 6331 | | 194233 | 196567 | 15910 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁶+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 117683 | | | | 358317 | | |
| | | 170992 | | | | 414600 | | |
| | | 162350 | | | | 383267 | | |
| | | 177242 | 157067 | 26956 | | 429333 | 396379 | 31826 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁵+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 129783 | | | | 339717 | | |
| | | 136992 | | | | 386550 | | |
| | | 118142 | | | | 416233 | | |
| | | 150892 | 133952 | 13706 | | 393700 | 384050 | 32149 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁴+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 90175 | | | | 272633 | | |
| | | 118342 | | | | 301067 | | |
| | | 93392 | | | | 380700 | | |
| | | 111600 | 103377 | 13730 | | 286300 | 310175 | 48429 |

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender B an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

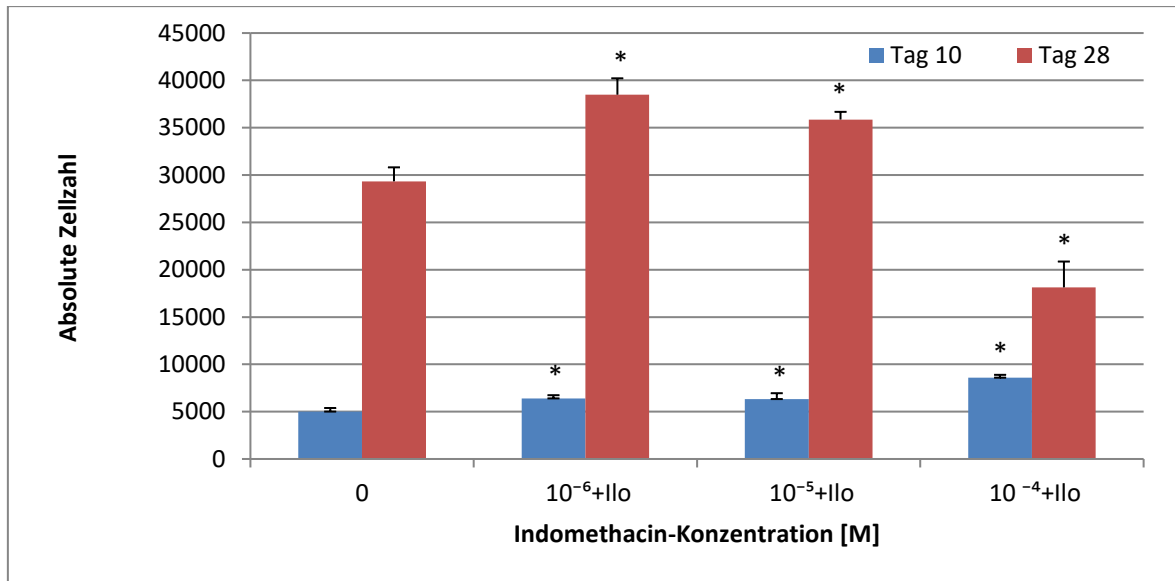


Abbildung 11: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit Iloprost (Ilo). * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| 0 vs. 10^{-6} +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10^{-5} +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10^{-4} +Ilo | <0,05 | <0,05 |

Tabelle 12: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost mit der Kontrolle (0). Spender C.

| Spender C | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
|---------------|--------|-------------|------|-------|--------|-------------|-------|-------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 4779 | | | | 29350 | | |
| | | 5554 | | | | 28860 | | |
| | | 4734 | | | | 27817 | | |
| | | 4975 | 5011 | 377 | | 31330 | 29339 | 1473 |
| | | | | | | | | |
| $10^{-6}+Ilo$ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 6020 | | | | 36048 | | |
| | | 6389 | | | | 40143 | | |
| | | 6842 | | | | 38822 | | |
| | | 6359 | 6403 | 338 | | 38932 | 38486 | 1732 |
| | | | | | | | | |
| $10^{-5}+Ilo$ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 5828 | | | | 34892 | | |
| | | 6317 | | | | 36712 | | |
| | | 7207 | | | | 36310 | | |
| | | 5976 | 6332 | 618 | | 35553 | 35867 | 808 |
| | | | | | | | | |
| $10^{-4}+Ilo$ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 8859 | | | | 17073 | | |
| | | 8840 | | | | 14910 | | |
| | | 8356 | | | | 19393 | | |
| | | 8311 | 8592 | 299 | | 21162 | 18135 | 2725 |

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender C an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

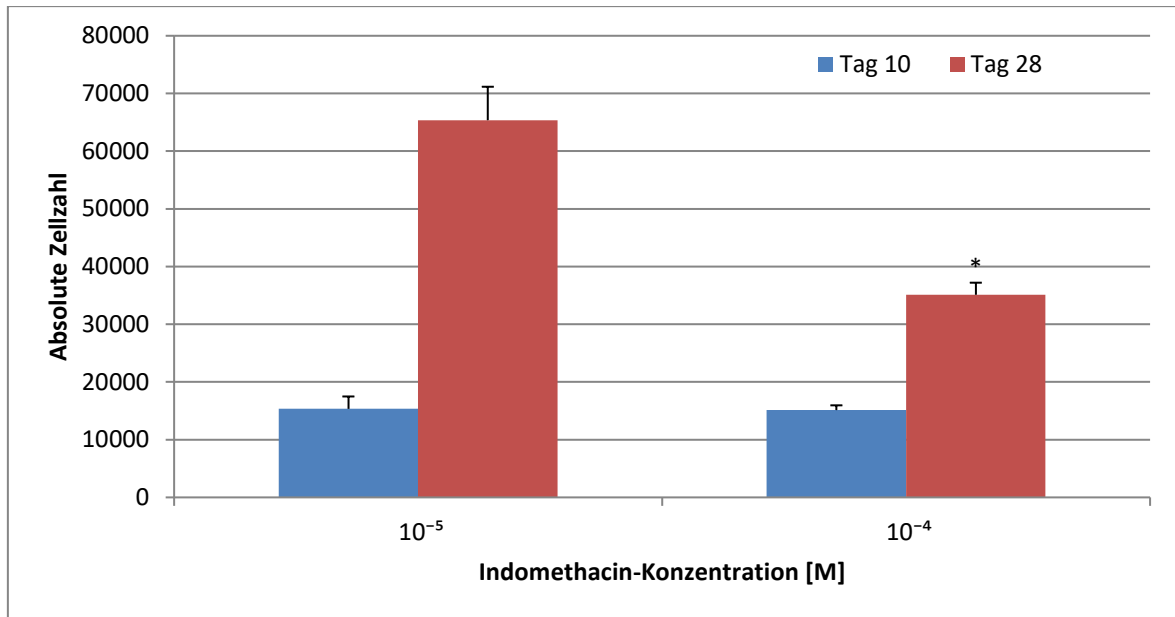


Abbildung 12: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte der beiden Konzentrationen). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| 10^{-5} vs. 10^{-4} | 0,867 | <0,05 |

Tabelle 14: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen der Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-4} M. Spender D.

| Spender D | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
|-------------|--------|-------------|-------|-------|--------|-------------|--------|-------|
| 10^{-5} M | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 65713 | | | | 289467 | | |
| | | 88830 | | | | 321350 | | |
| | | 69933 | | | | 339267 | | |
| | | 82353 | 76708 | 10733 | | 357400 | 326871 | 28955 |
| 10^{-4} M | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 77497 | | | | 163383 | | |
| | | 73393 | | | | 177675 | | |
| | | 80473 | | | | 172750 | | |
| | | 71453 | 75704 | 4057 | | 188508 | 175579 | 10461 |

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender D an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.



| Spender E | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
|-----------|--------|-------------|-------|-------|--------|-------------|--------|-------|
| 10^{-5} | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 42910 | | | | 287200 | | |
| | | 46270 | | | | 283363 | | |
| | | 51360 | | | | 178100 | | |
| | | 51650 | 48048 | 4223 | | 238175 | 246709 | 50869 |
| Spender F | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
| 10^{-6} | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 65045 | | | | 199592 | | |
| | | 60540 | | | | 223808 | | |
| | | 65590 | | | | 225725 | | |
| | | 64235 | 63853 | 2277 | | 202167 | 212823 | 13854 |
| Spender G | | Zellen/well | MW | STABW | | Zellen/well | MW | STABW |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 19092 | | | | 32275 | | |
| | | 21717 | | | | 36492 | | |
| | | 19635 | | | | 36567 | | |
| | | 20707 | 20288 | 1166 | | 40275 | 36402 | 3269 |

Abbildung 13: Grafische und tabellarische Darstellung der absoluten Zellzahlen der Spender E , F und G an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M (Spender E), und 10^{-6} M (Spender F) und 0+Ilo (Spender G). MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

Die Ergebnisse des *CytoTox96®*-Assay lassen keine eindeutige Tendenz erkennen, ob eine steigende Indomethacinkonzentration zu einer Suppression der Proliferation an Tag 10 und 28 im Vergleich zur Kontrolle führt. Die Daten von Spender A und D lassen eine dosisabhängige Suppression der Proliferation an Tag 28 vermuten. Proliferative Effekte durch alleinige Zugabe von Iloprost im Vergleich zur Kontrolle konnten weder für die Zellen von Spender A, noch von Spender B nachgewiesen werden. In Kombination mit Indomethacin förderte Iloprost die Proliferation der MSCs an beiden Zeitpunkten. Zudem ließ sich unter der Kombination von Indomethacin und Iloprost eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Zellzahl an Tag 10 bei Spender A und B und an Tag 28 bei Spender B feststellen.

3.4 Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Differenzierung von MSCs

3.4.1 Ergebnisse der immunzytochemischen Analyse

Zur Untersuchung der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten wurde mittels immunzytochemischer Analyse die Expression von CD34, CD45, CD105, Col1, OC, Runx2, Twist und ALP in den Versuchsansätzen der Spender A-G (siehe Tabelle 1) an Tag 10 und 28 untersucht. Zur semiquantitativen Auswertung der Intensität der Färbung wurden, wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben, vier Kategorien festgelegt: - = Fehlen einer immunzytochemischen Färbung, + = weniger als 50%, ++ = 50-75% und +++ = >75% angefärbte Zielstrukturen. Zur Verdeutlichung dieser Kategorisierung zeigt Abbildung 14 exemplarisch die Auswertung des Versuchsansatzes Kontrolle 0 von Spender A.

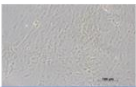

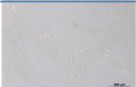

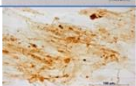

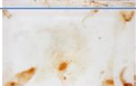
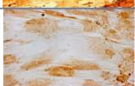
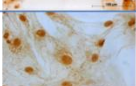


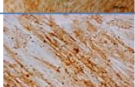


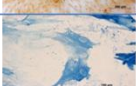
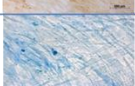
| Spender A | | | | |
|-----------|--|------------|--|------------|
| | Tag 10 Kontrolle 0 | Auswertung | Tag 28 Kontrolle 0 | Auswertung |
| CD 34 |  | - |  | - |
| CD 45 |  | - |  | - |
| CD 105 |  | +++ |  | +++ |
| Col1 |  | + |  | ++ |
| Runx 2 |  | ++ |  | +++ |
| Twist |  | + |  | ++ |
| OC |  | + |  | ++ |
| ALP |  | ++ |  | ++ |

Abbildung 14: Immunzytochemische Untersuchung der Expression von CD34, CD45, CD105, Col1, OC, Runx2, Twist und ALP in MSCs aus dem Knochenmark von Spender A an Tag 10 und 28 ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost. Die Expression der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 konnte nicht nachgewiesen werden (-), wohingegen der mesenchymale Marker CD105 stark exprimiert wurde (+++). 400-fache Vergrößerung

Die Ergebnisse entsprechender Versuchsansätze unterschieden sich zwischen den Spendern nur geringfügig und wurden in Tabelle 16 zusammengefasst. Wenn die Intensität der Färbung entsprechender Versuchsansätze im Vergleich der Spender zwischen zwei Kategorien lag, wurde zur höheren Kategorie aufgerundet. Für die Auswertung der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Twist wurde nur die Expression im Zellkern berücksichtigt. Runx2 induziert über die Bindung an die Promotoren knochenspezifischer Gene beispielsweise die Expression von Osterix, *bone sialoprotein*, Col1 und OC. Twist übt seine antiosteogene Funktion über die Interaktion der Twist-Box mit der Runx2-Bindungsdomäne ebenfalls im Zellkern aus (Bialek *et al*, 2004; Miraoui *et al*, 2010).

| Tag 10 | 0 | 10 ⁻⁶ M | 10 ⁻⁵ M | 10 ⁻⁴ M | 0+Ilo | 10 ⁻⁶ M+Ilo | 10 ⁻⁵ M+Ilo | 10 ⁻⁴ M+Ilo |
|--------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|-------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CD34 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CD45 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CD105 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Col1 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Runx2 | ++ | ++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Twist | + | + | ++ | + | ++ | - | - | - |
| OC | + | ++ | ++ | + | + | + | + | + |
| ALP | ++ | + | + | + | ++ | + | ++ | ++ |

| Tag 28 | 0 | 10 ⁻⁶ M | 10 ⁻⁵ M | 10 ⁻⁴ M | 0+Ilo | 10 ⁻⁶ M+Ilo | 10 ⁻⁵ M+Ilo | 10 ⁻⁴ M+Ilo |
|--------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|-------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CD34 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CD45 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CD105 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Col1 | ++ | + | + | + | ++ | ++ | ++ | + |
| Runx2 | +++ | ++ | ++ | + | +++ | +++ | ++ | ++ |
| Twist | ++ | + | + | - | +++ | - | - | - |
| OC | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| ALP | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ |

Tabelle 16: Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der immunzytochemischen Analyse aller Versuchsansätze bezüglich des Anteils gefärbter Zielstrukturen: - = Fehlen einer immunzytochemischen Färbung, + = weniger als 50%, ++ = 50-75% und +++ = >75% angefärbte Zielstrukturen. Die rot hinterlegten Felder weisen auf die Suppression von Twist unter Kombination von Indomethacin und Iloprost hin.

In keinem Versuchsansatz konnte eine Expression der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 an Tag 10 und 28 nachgewiesen werden, wohingegen CD105 als Marker mesenchymaler Zellen stets deutlich positiv war. Zudem zeigte sich, dass die Runx2-Expression im Zellkern an Tag 10 und 28 durch Indomethacin ab den Konzentrationen 10⁻⁵ M und 10⁻⁴ M unterdrückt wurde - mit als auch ohne Iloprost (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Expression von Col1 und ALP wurde ebenfalls durch Indomethacin an Tag 10 und 28 im Vergleich zur Kontrolle 0 unterdrückt, allerdings ließ sich hier keine Dosisabhängigkeit feststellen.

Die Expression von OC wurde durch Indomethacin allein nicht wesentlich vermindert. Die alleinige Zugabe von Iloprost führte zu einer vermehrten nukleären Expression von Runx2 und auch in Kombination mit Indomethacin kam es im Vergleich zur alleinigen Indomethacingabe zu einer gesteigerten Runx2-Expression im Zellkern (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Dieser Effekt war an Tag 28 deutlicher festzustellen als an Tag 10. Ein ähnlicher Effekt konnte für ALP an Tag 10 und Col1 an Tag 28 festgestellt werden, sodass die Zugabe von Iloprost die Expression dieser Marker auf das Niveau der Kontrolle 0 brachte. Bemerkenswert ist, dass Twist unter einer Kombination von Indomethacin und Iloprost an Tag 10 und 28 im Zytoplasma und perinukleär, nicht aber im Zellkern exprimiert wurde. Hingegen konnte eine gesteigerte nukleäre Expression von Twist, unter dem Einfluss von Iloprost allein, im Vergleich zur Kontrolle 0, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Ebenso exprimierten die MSCs Twist unter alleiniger Zugabe von Indomethacin. Darüber hinaus wurde die Expression von Twist dosisabhängig von Indomethacin an Tag 28 unterdrückt, nicht jedoch an Tag 10.

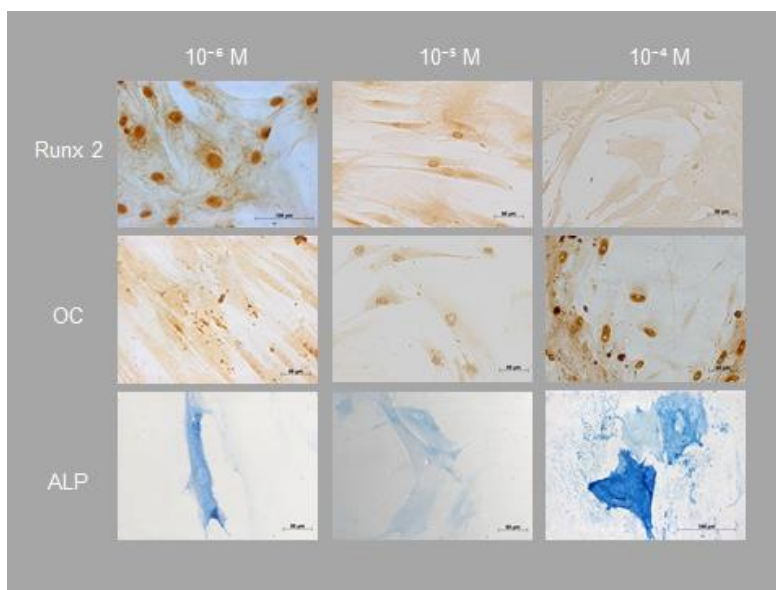


Abbildung 15: Expression von Runx2, OC und ALP mit steigender Indomethacin-Konzentration in MSCs von Spender A (10^{-6} M und 10^{-4} M) und B (10^{-5} M) an Tag 10. 400-fache Vergrößerung.

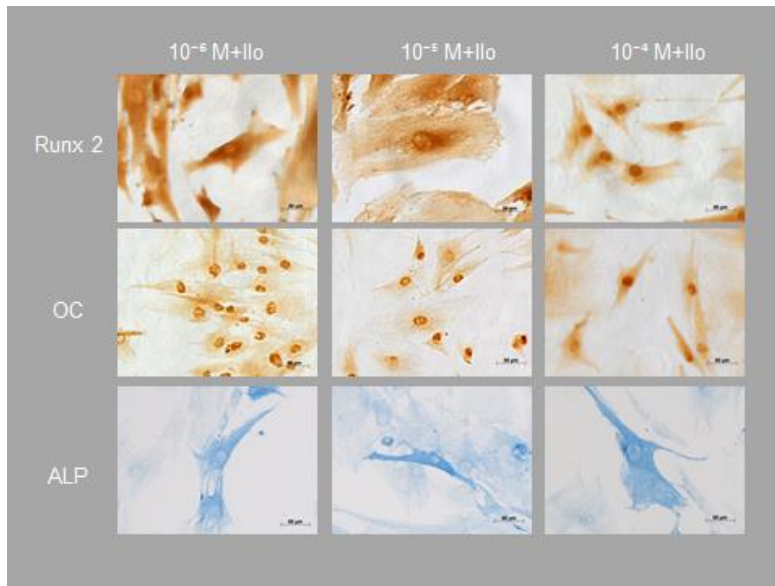


Abbildung 16: Expression von Runx2, OC und ALP mit steigender Indomethacin-Konzentration unter Zugabe von Iloprost in MSCs von Spender A an Tag 10. 400-fache Vergrößerung.

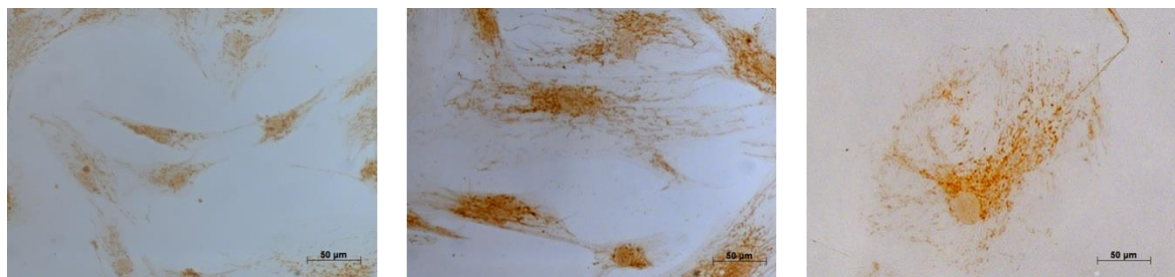


Abbildung 17: Expression von Twist der Versuchsansätze Kontrolle 0 (Spender C, links), 0+Ilo (Spender H, Mitte) und 10^{-6} M+Ilo (Spender C, rechts) an Tag 10. 400-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Indomethacin die Expression von Col1, ALP und Runx2 unterdrückt und Iloprost die Runx2-Expression fördert. Unter einer Kombination aus Indomethacin und Iloprost ließ sich keine nukleäre Expression von Twist mehr nachweisen,

3.5 Ergebnisse der RT-PCR

Um das Vorhandensein der Marker CD34, CD45, CD105, Col1, OC, Runx2 und ALP auf DNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine RT-PCR an Tag 10 und 28 durchgeführt, wie in Kapitel 2.8 beschrieben. Die Expression wurde nach erfolgter Agarosegelelektrophorese semiquantitativ anhand von Unterschieden in der Intensität der Banden in die Kategorien „nicht exprimiert“, „mäßig exprimiert“ und „stark exprimiert“ unterteilt (siehe Tabelle 17). CD34 wurde in keinem Versuchsansatz exprimiert. In der RT-PCR von Spender B und C zeigte sich eine mäßige Expression des hämatopoetischen Oberflächenmarker CD45 (siehe Abbildung 19), welche analog zur durchflusszytometrischen Analyse auf eine CD45-positve Subpopulation hinweist. ALP und OC wurden ebenfalls mäßig (siehe Abbildung 18 und Abbildung 20), CD105, Col1 und Runx2 wurden stark exprimiert (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21).

Anmerkung: Dem Autor ist bewusst, dass diese Auswertung nur eingeschränkt aussagekräftig ist und die gewonnenen Daten nur bedingt interpretierbar sind.

| | |
|------------------|--------------------|
| nicht exprimiert | CD34 |
| mäßig exprimiert | CD45, ALP, OC |
| stark exprimiert | CD105, Col1, Runx2 |

Tabelle 17: Semiquantitative Unterteilung der Expression der untersuchten Marker anhand der Bandenintensität in der Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR.

Die Abbildung 18 und Abbildung 21 zeigen exemplarische elektrophoretische Analysen eines RT-PCR-Ansatzes mit unterschiedlichen Spendern und Indomethacinkonzentrationen. Die Größe in Basenpaaren der amplifizierten *cDNA*-Abschnitte können durch Vergleich mit der *DNA*-Leiter eingeordnet werden. In Tabelle 18 sind die Größen der verwendeten Primer angegeben, deren Nukleotidsequenzen in Kapitel 2.8, Tabelle 6 aufgelistet sind.

Tabelle 19 zeigt die Zuordnung der *RNA*-Nummer zum Spender und untersuchten Versuchsansatz.

| | Primer | Größe in bp |
|---|--------|-------------|
| 1 | GAPDH | 755 |
| 2 | ALP | 454 |
| 3 | CD34 | 265 |
| 4 | CD45 | 590 |
| 5 | CD105 | 498 |
| 6 | OC | 209 |
| 7 | Runx2 | 452 |
| 8 | Col1 | 736 |

Tabelle 18: Größe der verwendeten Primer in Basenpaaren (bp). GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*housekeeping gene*), ALP = Alkalische Phosphatase, CD = (*cluster of differentiation*), OC = Osteocalcin, Runx2 = *Runt related transcription factor 2*, Col1 = Kollagen 1

| RNA-Nummer | Versuchsansatz |
|------------|---|
| 404 | Spender B Kontrolle 0 Tag 10 |
| 405 | Spender B 10 ⁻⁵ M Tag 10 |
| 406 | Spender B 10 ⁻⁴ M Tag 10 |
| 407 | Spender H Kontrolle 0+Ilo Tag 10 |
| 408 | Spender B Kontrolle 0 Tag 28 |
| 409 | Spender B 10 ⁻⁵ M Tag 28 |
| 410 | Spender B 10 ⁻⁴ M Tag 28 |
| 411 | Spender H Kontrolle 0+Ilo Tag 28 |
| 426 | Spender C Kontrolle 0 Tag 10 |
| 427 | Spender C 10 ⁻⁶ M+Ilo Tag 10 |
| 428 | Spender C 10 ⁻⁵ M+Ilo Tag 10 |
| 429 | Spender C 10 ⁻⁴ M+Ilo Tag 10 |
| 438 | Spender C 10 ⁻⁶ M+Ilo Tag 28 |
| 439 | Spender C 10 ⁻⁵ M+Ilo Tag 28 |
| 440 | Spender C 10 ⁻⁴ M+Ilo Tag 28 |
| 441 | Spender C Kontrolle 0 Tag 28 |

Tabelle 19: RNA-Nummern und zugehöriger Versuchsansatz zur Agarosegelelektrophorese der RT-PCR in den Abbildungen 28-31.

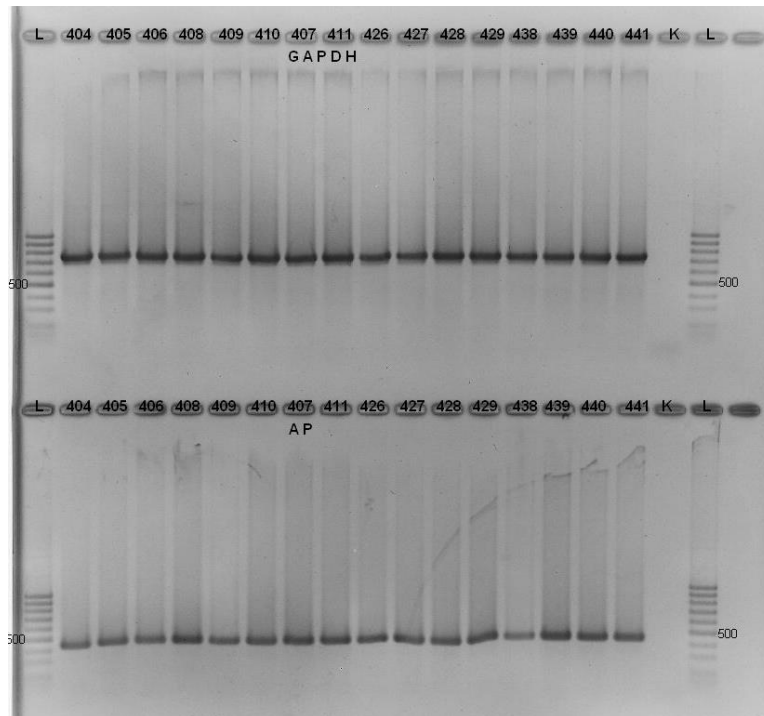


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für GAPDH und ALP (hier AP). L = DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K = Kontrolle aus *aqua bidestillata*, 500 = 500 Basenpaare

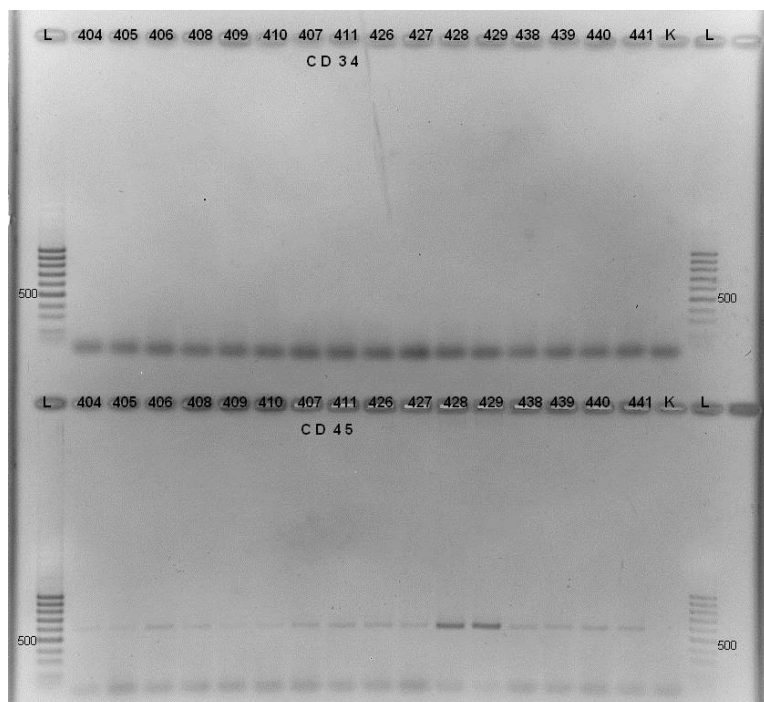


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für CD34 und CD45. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus *aqua bidestillata*, 500 = 500 Basenpaare

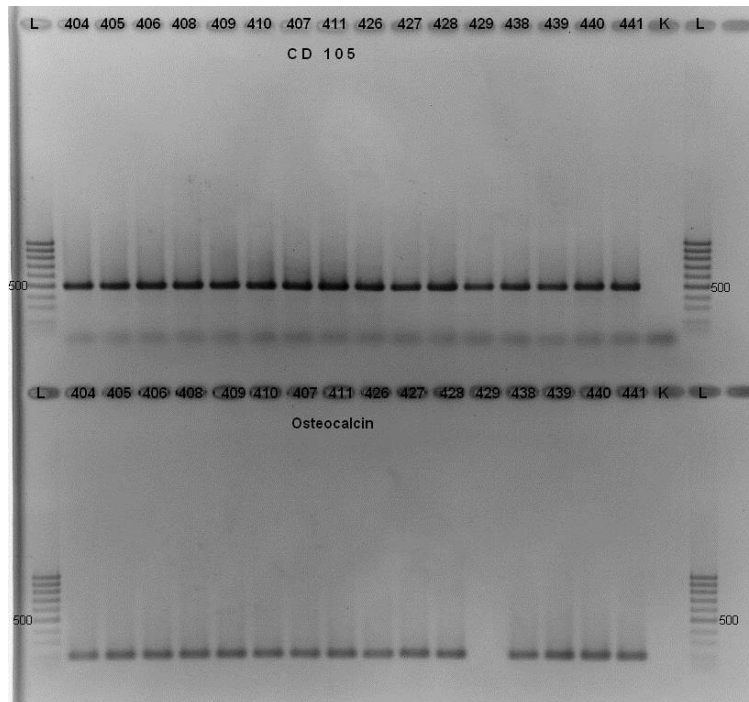


Abbildung 20: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für CD105 und OC. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus *aqua bidestillata*, 500 = 500 Basenpaare

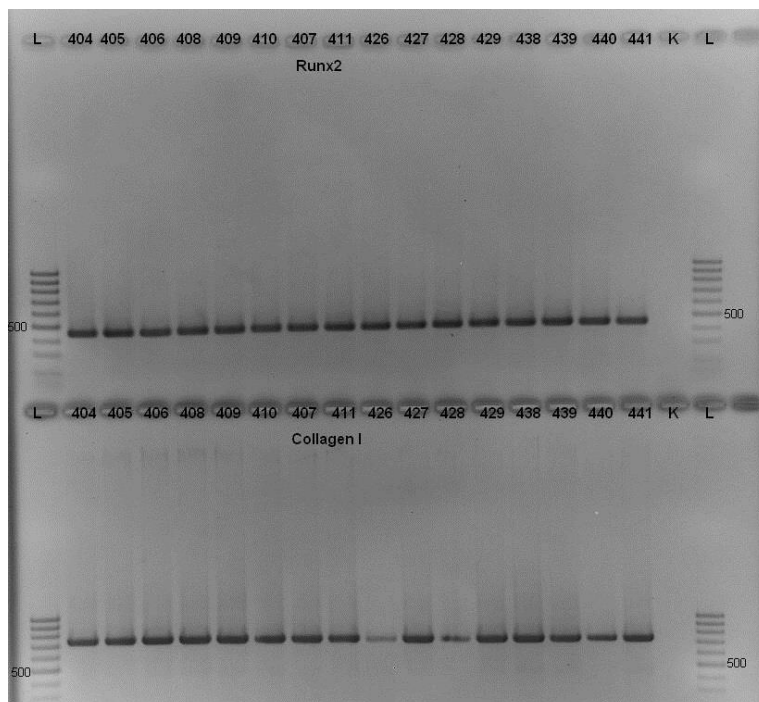


Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für Runx2 und Col1. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus *aqua bidestillata*, 500 = 500 Basenpaare

Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass CD34 nicht exprimiert, CD45, ALP und OC mäßig und CD105, Col1 und Runx2 stark exprimiert wurden. Demnach liegt eine CD45-positive Subpopulation neben mesenchymalen und osteoblastären Zellen vor.

3.6 Ergebnisse von BCA- und ALP-Assay zur Bestimmung der spezifischen ALP-Aktivität

Zur Ermittlung der spezifischen ALP-Aktivität wurden die Ergebnisse des ALP-Assays ins Verhältnis zur Proteinkonzentration gesetzt, die mittels BCA-Assay untersucht wurde. Die spezifische ALP-Aktivität wird in dieser Arbeit als ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde mit der Einheit $\mu\text{Units}/\mu\text{g}\cdot\text{hour}$ angegeben. Die Ergebnisse der ALP-Assays wurden, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, berechnet, anschließend durch die Messwerte des BCA-Assays der gleichen Konzentration geteilt und darauf von Minuten auf Stunden umgerechnet. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze der MSCs aus dem Knochenmark der Spender A-G dargestellt.

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse der BCA-Assays von MSCs der Spender A, B und H ohne Zugabe von Indomethacin und Iloprost im zeitlichen Verlauf sowie der Versuchsansätze von Spender A und B dargestellt werden. Anschließend werden die Ergebnisse der spezifischen ALP-Aktivität im zeitlichen Verlauf ohne Zugabe von Indomethacin und Iloprost (Spender A, B und H) sowie die Ergebnisse der Einzelversuche (Spender A-G) präsentiert.

3.6.1 BCA-Assay

Zur Kontrolle des Anstieges der Proteinkonzentration über die Zeit wurden nicht-beimpfte MSCs der Spender A, B und H über 28 Tage kultiviert und alle vier Tage BCA-Assays durchgeführt (siehe Abbildung 22). Dabei zeigte sich ein annähernd linearer Anstieg der Proteinkonzentration mit zunehmender Zellkulturdauer bis zum Tag 20. An Tag 24 fiel die Proteinkonzentration in den Versuchen aller Spender ab und stieg bei Spender A und B bis Tag 28 wieder an. Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf konnte bei der Kontrolle der Zellproliferation mittels CytoTox®96-Assay beobachtet werden (siehe Abbildung 8).

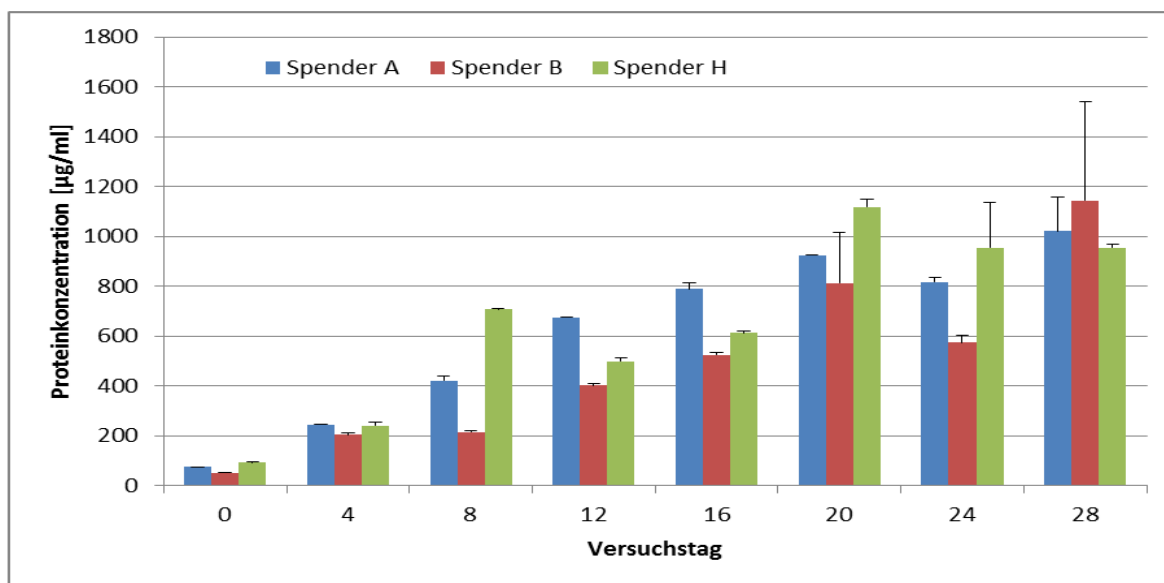


Abbildung 22: Proteinkonzentration der MSCs von Spender A, B und H im zeitlichen Verlauf. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

Weiter wurde der Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Proteinkonzentration der MSCs untersucht. Tabelle 20 zeigt die gemittelte Proteinkonzentration der Versuchsansätze der Spender A-G. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Zellkulturen der Spender A und B aufgeführt. Weder in diesen Versuchen, noch in den Assays der hier nicht aufgeführten Versuchsansätze der Spender C-G, ließ sich ein eindeutiger Einfluss von Indomethacin auf die Proteinkonzentration feststellen. Allerdings scheint die Zugabe von Iloprost in allen drei Indomethacin-Konzentrationen die Proteinkonzentration zu erhöhen. In beiden Spenderreihen liegen die Konzentrationen der mit Iloprost versetzten Ansätze über denen der Kontrollen (siehe Abbildung 23). Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte, nachdem die Ergebnisse des BCA-Assays in Relation zur ALP-Aktivität gesetzt wurden (siehe Kapitel 3.6.3).

| | Versuchsansatz | 0 | 10^{-6} M | 10^{-5} M | 10^{-4} M | 0+Ilo | 10^{-6} M+Ilo | 10^{-5} M+Ilo | 10^{-4} M+Ilo |
|-----------|----------------|------|-------------|-------------|-------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Spender A | Tag 10 | 280 | 379 | | 406 | 322 | 265 | 412 | 265 |
| | Tag 28 | 840 | 618 | | 618 | 845 | 1036 | 1173 | 974 |
| Spender B | Tag 10 | 354 | | 277 | 567 | 668 | 547 | 577 | 457 |
| | Tag 28 | 915 | | 829 | 1593 | 673 | 1447 | 1449 | 1353 |
| Spender C | Tag 10 | 1007 | | | | | 952 | 990 | 998 |
| | Tag 28 | 785 | | | | | 697 | 810 | 559 |
| Spender D | Tag 10 | | | 483 | 378 | | | | |
| | Tag 28 | | | 1156 | 1107 | | | | |
| Spender E | Tag 10 | | | 159 | | | | | |
| | Tag 28 | | | 510 | | | | | |
| Spender F | Tag 10 | | 540 | | | | | | |
| | Tag 28 | | 1141 | | | | | | |
| Spender G | Tag 10 | | | | | 530 | | | |
| | Tag 28 | | | | | 871 | | | |

Tabelle 20: Gemittelte spezifische ALP-Aktivität in $\mu\text{Units}/\mu\text{g}\cdot\text{hour}$ der Versuchsansätze der Spender A-G an Tag 10 und 28.

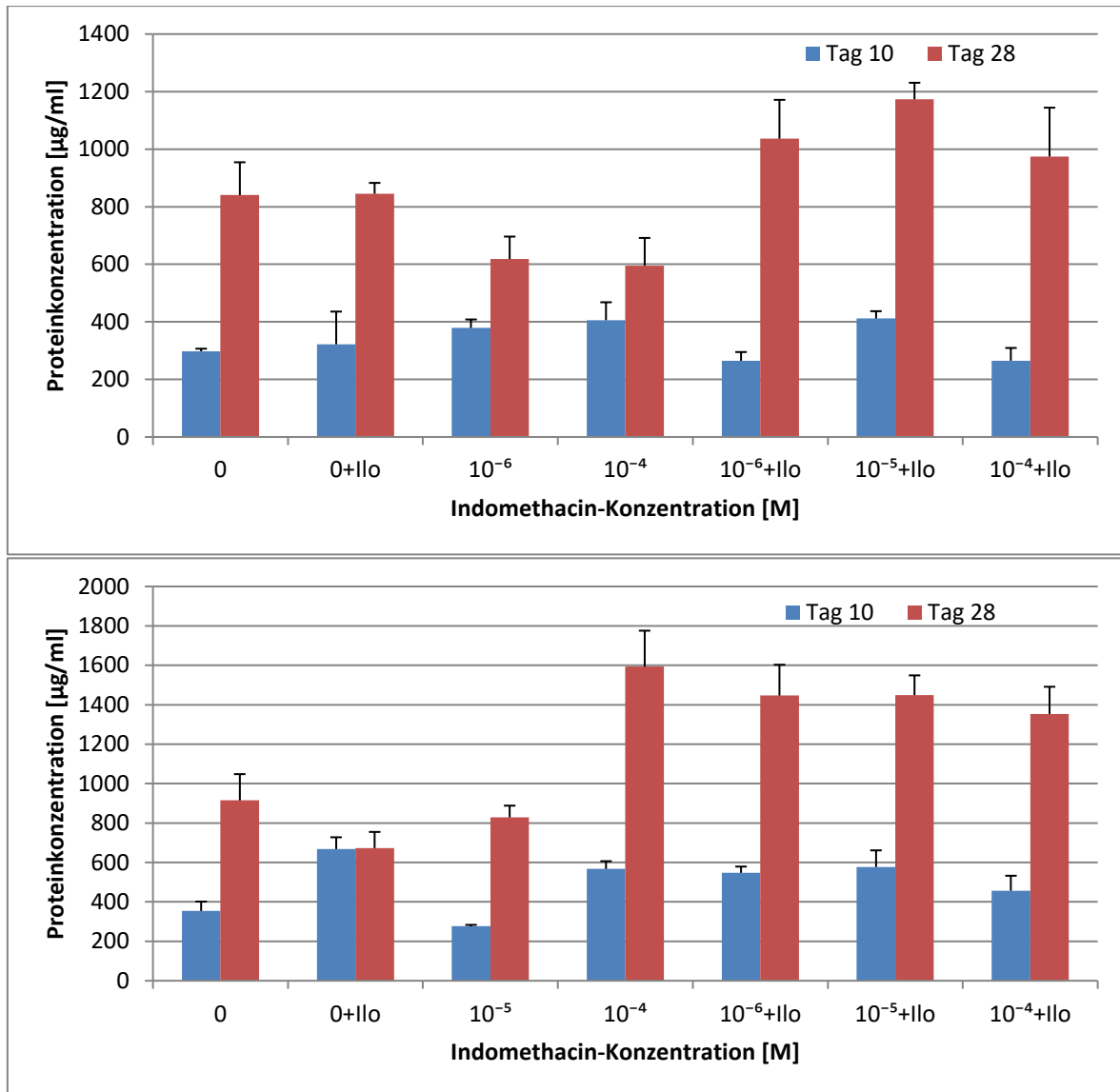


Abbildung 23: Proteinkonzentration von Spender A (oben) und B (unten) an den Versuchstagen 10 und 28 unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne 10^{-7} M Iloprost. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

3.6.2 Spezifische ALP-Aktivität

Zur Kontrolle der spezifischen ALP-Aktivität im zeitlichen Verlauf wurden MSCs der Spender A, B und H über 28 Tage ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost kultiviert und alle vier Tage mittels BCA- und ALP-Assay die spezifische ALP-Aktivität bestimmt. Dabei fiel auf, dass die spezifische ALP-Aktivität nicht wie die Zellzahl (siehe Abbildung 8) oder die Proteinkonzentration (siehe Abbildung 22) annähernd linear über die Zeit anstieg. Es zeigte sich eher ein periodisches Ansteigen und Absinken der spezifischen ALP-Aktivität, was vor allem in den MSCs von Spender A und B zu beobachten war. In den MSCs von Spender H stieg die spezifische ALP-Aktivität bis zum Tag 16 an und fiel bis zum Tag 28 ab. Die Zellen aller Spender zeigten den steilsten Anstieg zwischen Tag 4 und 8.

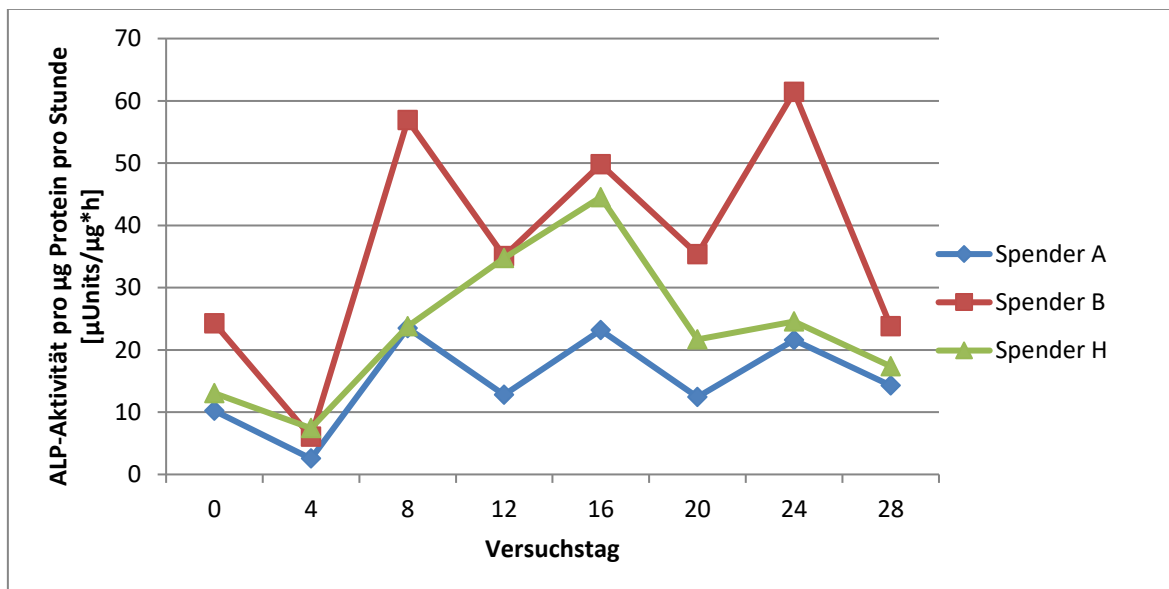


Abbildung 24: Spezifische ALP-Aktivität der Zellreihen Spender A, B und H ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost im Verlauf des Versuchs.

3.6.3 Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die spezifische ALP-Aktivität

Die Daten zeigten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Indomethacin-Konzentration und einer Reduktion der spezifischen ALP-Aktivität. Dennoch konnte eine signifikante Abnahme der spezifischen ALP-Aktivität für Spender A mit 10^{-6} M Indomethacin (Tag 10) sowie für Spender B mit 10^{-4} M Indomethacin (Tag 10 und 28) festgestellt werden (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). In den MSCs von Spender D wurde unter der höchsten untersuchten Indomethacin-Konzentration (10^{-4} M) an Tag 10 eine höhere spezifische ALP-Aktivität gemessen, als unter der mittleren Indomethacin-Konzentration (10^{-5} M). An Tag 28 kehrte sich dieser Effekt jedoch um (siehe Abbildung 28). Auch in Kombination von Indomethacin und Iloprost zeigten sich spenderabhängig unterschiedliche Effekte: In den MSCs von Spender A konnte eine leichte Steigerung der spezifischen ALP-Aktivität beobachtet werden, wohingegen in den MSCs von Spender B die spezifische ALP-Aktivität im Vergleich zur korrespondierenden Indomethacin-Konzentration abnahm. In den Versuchsansätzen mit den MSCs von Spender C kam es an Tag 28 in der Konzentration 10^{-4} M+Ilo zu einem signifikanten Anstieg der spezifischen ALP-Aktivität (siehe Abbildung 27).

Die alleinige Zugabe von Iloprost steigerte in den MSCs der Spender A und B die spezifische ALP-Aktivität an Tag 28 im Vergleich zur Kontrolle 0.

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Zellreihen sind im Folgenden grafisch und tabellarisch dargestellt. Bei mehr als einem Versuchsansatz pro Spender wurden die Ergebnisse verglichen und auf statistische Signifikanz mittels abhängigem t-Test geprüft.

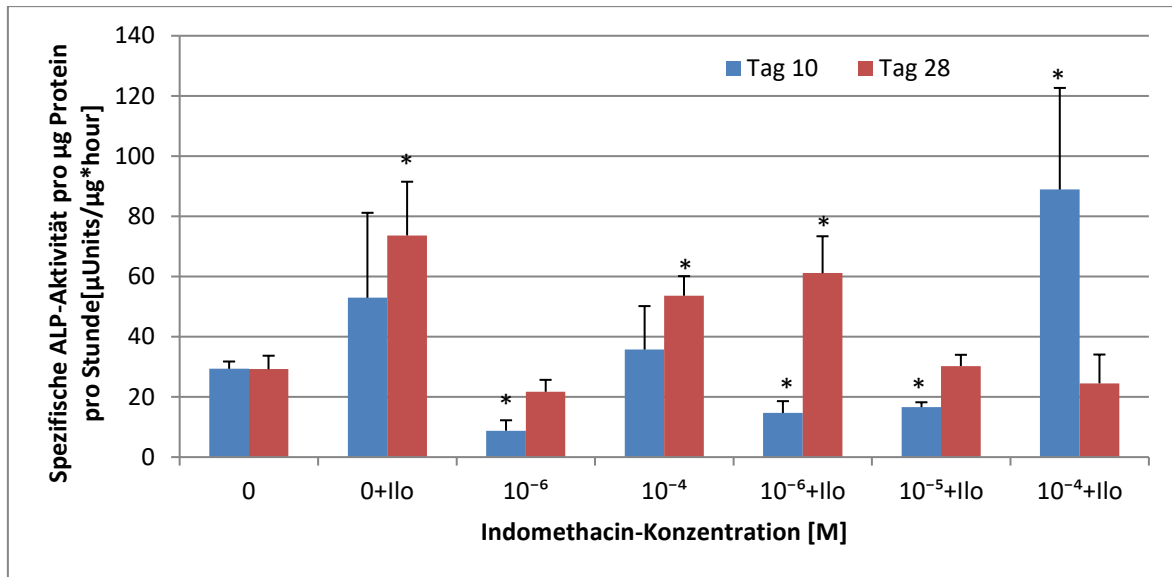


Abbildung 25: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|--|---------------|---------------|
| 0 vs. 0+Ilo | 0,73 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁶ | 0,115 | 0,284 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ | 0,614 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,253 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁵ +Ilo | 0,32 | 0,879 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | <0,05 | 0,496 |
| 10 ⁻⁶ vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,643 | <0,05 |

Tabelle 21: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle (0) sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender A.

| Spender A | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STBAW |
|-----------------------|--------|--------------------------|-------|-------|--------|--------------------------|-------|-------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 30,34 | | | | 33,70 | | |
| | | 25,72 | | | | 24,48 | | |
| | | 30,73 | | | | 32,29 | | |
| | | 30,58 | 29,34 | 2,42 | | 26,39 | 29,22 | 4,47 |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 38,74 | | | | 78,06 | | |
| | | 87,80 | | | | 51,35 | | |
| | | 62,12 | | | | 94,40 | | |
| | | 23,11 | 52,94 | 28,23 | | 70,83 | 73,66 | 17,84 |
| 10 ⁻⁶ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 6,91 | | | | 16,00 | | |
| | | 7,51 | | | | 24,81 | | |
| | | 13,94 | | | | 23,78 | | |
| | | 6,77 | 8,78 | 3,45 | | 22,27 | 21,72 | 3,95 |
| 10 ⁻⁴ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 53,19 | | | | 44,73 | | |
| | | 36,25 | | | | 53,41 | | |
| | | 35,67 | | | | 59,95 | | |
| | | 17,83 | 35,73 | 14,44 | | 56,41 | 53,63 | 6,50 |
| 10 ⁻⁶ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 18,32 | | | | 49,16 | | |
| | | 15,22 | | | | 51,99 | | |
| | | 16,01 | | | | 72,35 | | |
| | | 9,12 | 14,67 | 3,92 | | 71,02 | 61,13 | 12,25 |
| 10 ⁻⁵ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 17,75 | | | | 28,06 | | |
| | | 18,22 | | | | 35,79 | | |
| | | 15,01 | | | | 27,93 | | |
| | | 15,48 | 16,61 | 1,60 | | 29,27 | 30,26 | 3,73 |
| 10 ⁻⁴ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 74,38 | | | | 12,38 | | |
| | | 60,45 | | | | 22,53 | | |
| | | 137,56 | | | | 35,04 | | |
| | | 83,23 | 88,90 | 33,76 | | 28,09 | 24,51 | 9,57 |

Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

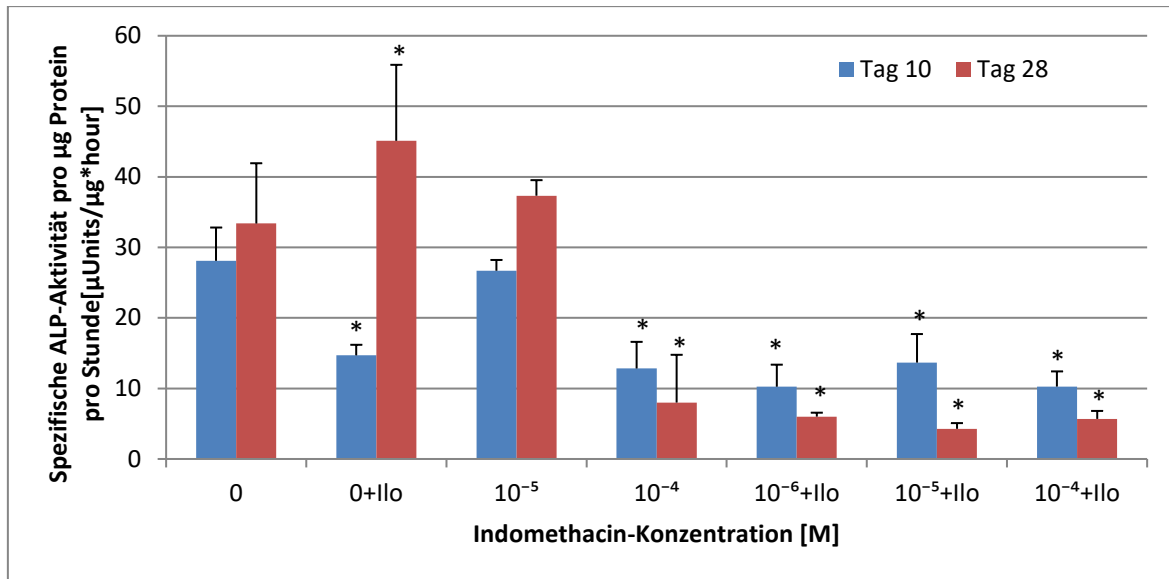


Abbildung 26: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|--|---------------|---------------|
| 0 vs. 0+Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁵ | 0,111 | 0,506 |
| 0 vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁵ +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 10 ⁻⁶ vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,225 | <0,05 |
| 10 ⁻⁵ vs. 10 ⁻⁵ +Ilo | <0,05 | <0,05 |
| 10 ⁻⁴ vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | 0,218 | 0,184 |

Tabelle 23: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle (0) sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender B.

| Spender B | | Spez. ALP-Aktivität/ well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/ well | MW | STABW |
|----------------------------|---------------|---------------------------|-------|-------|---------------|---------------------------|--------------|-------------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 32,32 | | | | 23,13 | | |
| | | 24,25 | | | | 30,87 | | |
| | | 32,03 | | | | 36,14 | | |
| | | 23,78 | 28,10 | 4,72 | | 43,39 | 33,38 | 8,55 |
| | | | | | | | | |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 14,15 | | | | 31,22 | | |
| | | 13,10 | | | | 41,97 | | |
| | | 14,85 | | | | 54,26 | | |
| | | 16,66 | 14,69 | 1,50 | | 52,98 | 45,11 | 10,77 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁵ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 26,45 | | | | 30,81 | | |
| | | 28,27 | | | | 45,42 | | |
| | | 21,58 | | | | 32,77 | | |
| | | 30,43 | 26,68 | 3,77 | | 40,29 | 37,32 | 6,77 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁴ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 16,59 | | | | 7,83 | | |
| | | 13,89 | | | | 8,81 | | |
| | | 11,50 | | | | 7,58 | | |
| | | 9,35 | 12,83 | 3,12 | | 7,79 | 8,00 | 0,55 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁶+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 4,50 | | | | 7,14 | | |
| | | 10,94 | | | | 5,30 | | |
| | | 11,61 | | | | 6,03 | | |
| | | 13,95 | 10,25 | 4,04 | | 5,56 | 6,01 | 0,81 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁵+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 14,51 | | | | 4,56 | | |
| | | 10,93 | | | | 3,03 | | |
| | | 16,00 | | | | 3,84 | | |
| | | 13,22 | 13,67 | 2,15 | | 5,68 | 4,28 | 1,13 |
| | | | | | | | | |
| 10⁻⁴+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 11,29 | | | | 5,99 | | |
| | | 10,91 | | | | 3,32 | | |
| | | 9,95 | | | | 3,60 | | |
| | | 8,92 | 10,27 | 1,06 | | 9,83 | 5,68 | 3,01 |

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

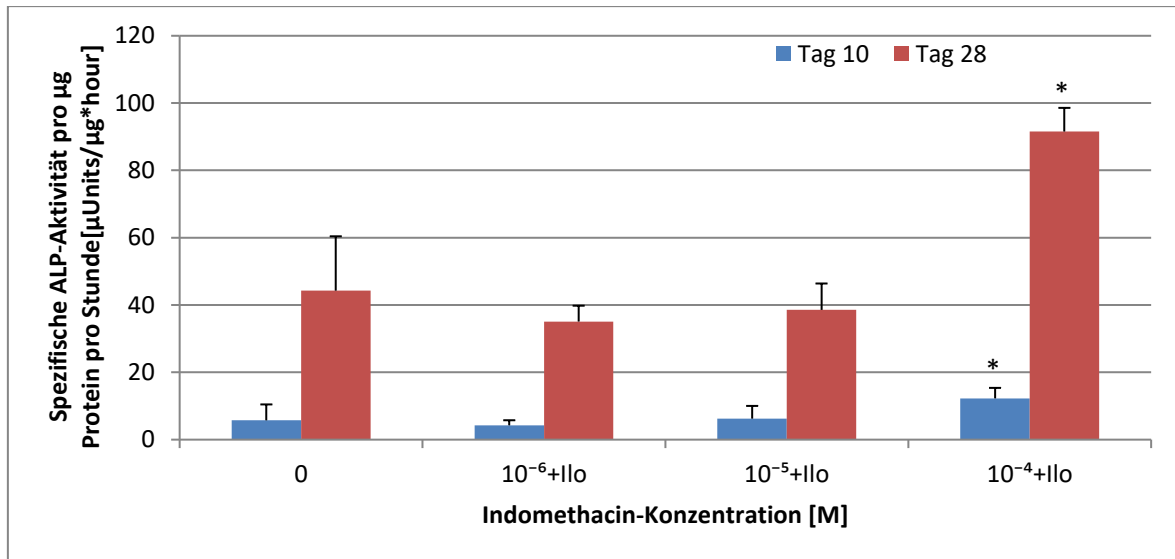


Abbildung 27: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| 0 vs. 10 ⁻⁶ +Ilo | 0,311 | 0,215 |
| 0 vs. 10 ⁻⁵ +Ilo | 0,739 | 0,433 |
| 0 vs. 10 ⁻⁴ +Ilo | <0,05 | <0,05 |

Tabelle 25: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit Zugabe von Iloprost (Ilo) mit der Kontrolle (0). Spender C.

| Spender C | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW |
|-----------------------|--------|--------------------------|-------|-------|--------|--------------------------|-------|-------|
| 0 | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 5,70 | | | | 36,62 | | |
| | | 4,68 | | | | 27,33 | | |
| | | 7,37 | | | | 48,35 | | |
| | | 5,24 | 5,74 | 1,16 | | 64,77 | 44,27 | 16,15 |
| | | | | | | | | |
| 10 ⁻⁶ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 5,07 | | | | 32,44 | | |
| | | 5,25 | | | | 30,34 | | |
| | | 3,56 | | | | 36,66 | | |
| | | 3,17 | 4,26 | 1,05 | | 40,93 | 35,09 | 4,70 |
| | | | | | | | | |
| 10 ⁻⁵ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 7,25 | | | | 45,08 | | |
| | | 7,21 | | | | 29,16 | | |
| | | 5,83 | | | | 44,96 | | |
| | | 4,69 | 6,24 | 1,23 | | 34,98 | 38,54 | 7,84 |
| | | | | | | | | |
| 10 ⁻⁴ +Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 9,92 | | | | 85,69 | | |
| | | 9,01 | | | | 101,63 | | |
| | | 16,26 | | | | 88,25 | | |
| | | 13,84 | 12,26 | 3,39 | | 90,64 | 91,55 | 7,02 |

Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.

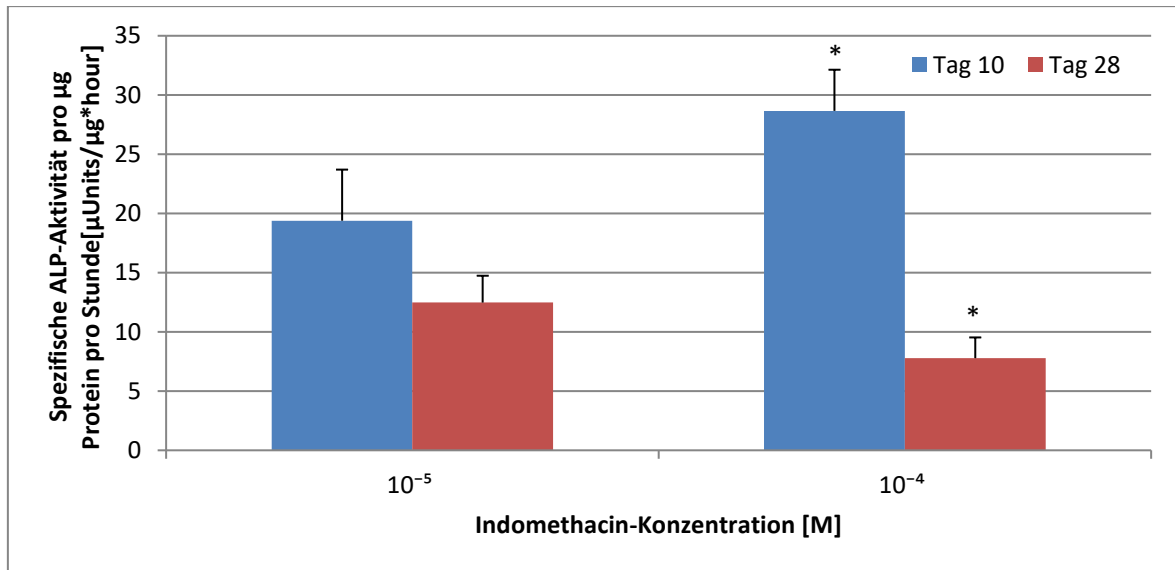


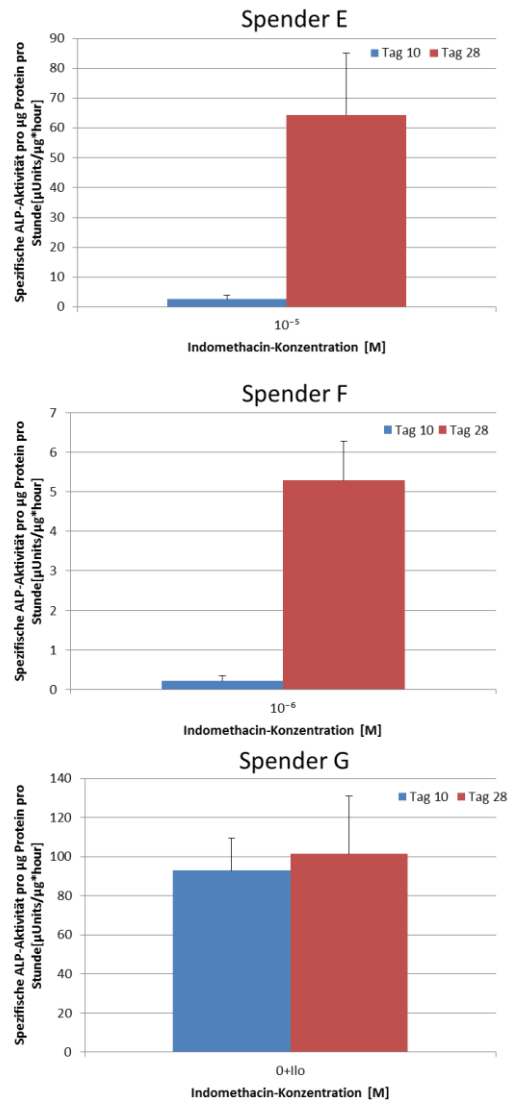
Abbildung 28: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte der beiden Konzentrationen. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung).

| Indomethacin-Konzentrationen [M] | p-Wert Tag 10 | p-Wert Tag 28 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|
| 10 ⁻⁵ vs. 10 ⁻⁴ | <0,05 | <0,05 |

Tabelle 27: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität der Indomethacin-Konzentrationen 10⁻⁵ M und 10⁻⁴ M mit der Kontrolle (0). Spender D.

| Spender D | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW |
|------------------|--------|--------------------------|-------|-------|--------|--------------------------|-------|-------|
| 10 ⁻⁵ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 15,53 | | | | 9,49 | | |
| | | 17,20 | | | | 14,99 | | |
| | | 19,43 | | | | 12,57 | | |
| | | 25,39 | 19,39 | 4,31 | | 12,86 | 12,48 | 2,26 |
| 10 ⁻⁴ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 25,60 | | | | 6,25 | | |
| | | 33,63 | | | | 6,41 | | |
| | | 28,05 | | | | 9,84 | | |
| | | 27,35 | 28,66 | 3,47 | | 8,62 | 7,78 | 1,75 |

Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro µg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.



| Spender E | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW |
|------------------|--------|--------------------------|-------|-------|--------|--------------------------|--------|-------|
| 10 ⁻⁵ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 1,87 | | | | 91,15 | | |
| | | 1,00 | | | | 69,90 | | |
| | | 3,95 | | | | 46,98 | | |
| | | 3,49 | 2,58 | 1,38 | | 49,30 | 64,33 | 20,63 |
| Spender F | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW |
| 10 ⁻⁶ | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 0,06 | | | | 4,71 | | |
| | | 0,25 | | | | 5,80 | | |
| | | 0,38 | | | | 6,03 | | |
| | | 0,16 | 0,21 | 0,13 | | 4,59 | 5,28 | 0,74 |
| Spender G | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW | | Spez. ALP-Aktivität/well | MW | STABW |
| 0+Ilo | Tag 10 | | | | Tag 28 | | | |
| | | 80,90 | | | | 120,36 | | |
| | | 88,16 | | | | 63,52 | | |
| | | 85,44 | | | | 128,83 | | |
| | | 117,09 | 92,90 | 16,40 | | 92,66 | 101,34 | 29,57 |

Abbildung 29: Grafische und tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität der Spender E, F und G an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10⁻⁵ M (spender E), und 10⁻⁶ M (Spender F) und 0+Ilo (Spender G). MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung)

Die Daten lassen keine eindeutige Aussage über den Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die spezifische ALP-Aktivität zu. Interindividuell gibt es große Unterschiede in den Ergebnissen mit teils gegensätzlichen Tendenzen. Die alleinige Zugabe von Iloprost führte zu einem Anstieg der spezifischen ALP-Aktivität in den Zellen von Spender A und B an Tag 28.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Indomethacin in den Konzentrationen 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M mit und ohne Zugabe von 10^{-7} M Iloprost auf die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) aus humanem Knochenmark untersucht. Die Ergebnisse der Versuche zeigten sowohl in der Bestimmung des Proliferationsverhalten als auch der Differenzierung der Zellen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern. Betrachtet man die die Einzelergebnisse, so ließ sich ein supprimierender Effekt von Indomethacin auf die Proliferation der MSCs bestätigen. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte dabei nicht bei allen Spendern festgestellt werden. Iloprost scheint die Proliferation in Kombination mit Indomethacin zu fördern, ein Effekt durch alleinige Zugabe von Iloprost konnte nicht beobachtet werden. Im Differenzierungsverhalten waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern noch deutlicher. Dass eine osteoblastäre Differenzierung der MSCs stattfindet, konnte durch den Nachweis der osteoblastären Marker Col1, OC, Runx2 und ALP in der immunzytochemischen Analyse und in der RT-PCR bestätigt werden. Eine klare Tendenz im Aktivitätsverhalten der spezifischen ALP konnte bei den verwendeten Zellen nicht festgestellt werden. In den Zellen der Spender A und B führte die alleinige Zugabe von Iloprost zu einer Steigerung der ALP-Aktivität. Bei der Auswertung der immunzytochemischen Analyse fiel auf, dass eine Kombination aus Indomethacin und Iloprost die nukleäre Expression von Twist unterdrückte. Der Effekt ließ sich unter allen verwendeten Indomethacinkonzentrationen nachweisen. Diese Beobachtung ist in der Literatur bisher nicht beschrieben und wird in Kapitel 4.3.5 genauer diskutiert.

Zunächst sollen die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens der MSCs mit anderen Studien verglichen werden. Anschließend folgen die Diskussion der Ergebnisse bezüglich der osteoblastären Differenzierung sowie die Einordnung der Studienergebnisse in den klinischen Kontext.

4.1 Proliferationsverhalten der MSCs unter Kulturbedingungen

Die MSCs proliferierten unter Kulturbedingungen ohne Zugabe von Indomethacin und Iloprost zwischen Tag 4 und Tag 20 mit einer Proliferationsrate von 1,407 (Spender A), 1,403 (Spender B) und 1,417 (Spender H).

Anschließend sank die Zellzahl in allen drei Zellreihen deutlich ab. Banfi *et al.* zeigten, dass sich die Proliferation von MSCs aus dem Knochenmark nach Tag 20 wesentlich verlangsamt (Banfi *et al.*, 2000). Eine Erklärung hierfür ist, dass die Zellpopulation das Platzangebot und die Nährstoffe seiner Kulturmgebung soweit ausnutzt, bis eine gleichbleibende Zellpopulation erreicht ist, wie es das logistische Wachstumsmodell nach Lotka-Volterra beschreibt (Wang *et al.*, 2013). Während die Zellen das Kulturmedium metabolisieren, könnte die Konzentration von mitogenen Faktoren wachstumslimitierend sein (Bruder *et al.*, 1997). Außerdem konnten Bruder *et al.* zeigen, dass sich der Anteil schnell teilender spindelförmiger Tochterzellen mit steigender Anzahl an Zellpassagen zugunsten von Zellen mit kompakter Morphologie und geringerer Teilungsrate verringerte (Bruder *et al.*, 1997).

4.2 Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Proliferation von MSCs

Die Änderung der Zellzahl stellt in dieser Arbeit einen wesentlichen Indikator für den Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Proliferation von MSCs dar. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde ein Laktatdehydrogenase (LDH)-basierter Zytotoxizitäts-Assay (CytoTox®96) photometrisch ausgewertet: Am Versuchstag 10 kam es in den Zellkulturen der Spender A und B unter Zugabe von Indomethacin zu einer Abnahme der Zellzahl (Spender A, 10^{-6} M und 10^{-4} M sowie Spender B, 10^{-5} M) im Vergleich zur Kontrolle 0. Dagegen stieg die Zellzahl am Tag 28 mit 10^{-6} M und 10^{-4} M Indomethacin in der Zellkultur Spender A an. Im direkten Vergleich der mittleren und der höchsten Indomethacin-Konzentration (Spender D) fiel ein Abfall der absoluten Zellzahl am Tag 28 unter 10^{-4} M Indomethacin auf. Aufgrund der inkonsistenten Ergebnisse und der kleinen Stichprobe kann hier keine Aussage zum Proliferationsverhalten der MSCs unter alleiniger Zugabe von Indomethacin in den untersuchten Konzentrationen getroffen werden. Unter Zugabe von Iloprost ließ sich in den Versuchsansätzen der Spender A, B und C beobachten, dass die Zellzahl umso stärker abnahm, je höher die Indomethacinkonzentration war. Da die Konzentration des Prostazyklins immer 10^{-7} M betrug, ist davon auszugehen, dass die Zellzahlunterschiede durch die unterschiedlich hohe Indomethacin-Konzentration verursacht wurden.

In verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Studien konnte ebenfalls ein inhibitorischer Effekt von NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) auf die Zellproliferation von MSCs und Osteoblasten nachgewiesen werden (Chang *et al*, 2007; Ho *et al*, 1999; Jin *et al*, 2008). Ho und Mitarbeiter untersuchten 1999 den Einfluss von Indomethacin und Ketorolac, ebenfalls ein NSAID, auf die Proliferation und Differenzierung von fetalen Osteoblasten der Ratte (Ho *et al*, 1999).

Dabei zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der Thymidinaufnahme nach 6 und 24 Stunden mit steigender Indomethacinkonzentration von 10^{-8} M bis 10^{-4} M. Im ALP-Assay stellten sie eine Aktivitätszunahme des Enzyms unter Ketorolac in den Konzentrationen 10^{-7} M bis 10^{-4} M fest und eine Abnahme mit 10^{-3} M. Des Weiteren untersuchten Ho *et al*. den Einfluss der Prostaglandine E_1 und E_2 auf die Zellproliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen in Osteoblasten mit dem Ergebnis, dass die Prostaglandine ebenso wie die NSAIDs das Wachstum und die Differenzierung der Osteoblasten hemmten. Ebenso konnten Chang *et al*. zeigen, dass die Prostaglandine E_1 , E_2 und $F_{2\alpha}$ die osteosuppressiven Effekte von NSAIDs auf die Proliferation humaner MSCs aus dem Knochenmark nicht aufheben konnten (Chang *et al*, 2007).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Prostazyklin (PGI_2) zeigte hingegen keine inhibitorischen Effekte auf die Zellproliferation, sondern konnte in einigen Versuchsansätzen in Kombination mit Indomethacin die Zellzahlen sogar steigern. In einer Zellpopulation, in der mittels NSAID die Prostaglandinsynthese (u.a. auch von PGE_2) unspezifisch inhibiert wird, könnte somit exogen zugegebenes Prostazyklin eine wichtige Rolle gegen NSAID-bedingte Inhibition des Knochenwachstums spielen.

Auf molekularbiologischer Ebene zeigten Glantschig *et al*. 1996, dass Prostazyklin bzw. dessen stabiles Konversionsprodukt 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, unter hydrostatisch-kompressivem Stress vermehrt in M3T3-E1- Zellen (Osteoblastenvorläuferzellen aus der Schädelkalotte der Maus) freigesetzt wird, während sich der PGE_2 -Spiegel nicht erhöhte (Glantschnig *et al*, 1996). Die mRNA von cfos, einem Teil des Aktivatorprotein-(AP-1)-Komplexes - einem Transkriptionsfaktor, der die Osteoblastenproliferation und -differenzierung fördert (Hengwei Z, n.d.) - stieg unter mechanischer Belastung ebenfalls an. Indomethacin in einer Konzentration von $0,5 \times 10^{-6}$ M verhinderte diesen Anstieg der cfos-mRNA, wohingegen die Zugabe von Iloprost die Transkription des cfos-Gens aktivierte (Glantschnig *et al*, 1996).

Betrachtet man die Pharmakodynamik von Indomethacin, so unterdrückt es die Synthese der Prostaglandine, inklusive die des Prostazyklins (Aktories *et al*, n.d.). Die Kombination von Indomethacin und Iloprost verringert somit die Konzentration aller Prostaglandine, bis auf PGI₂, welches in Form des stabileren Iloprosts exogen zugeführt wird.

In vivo könnte ein antagonistischer Effekt auf das Knochenwachstum zwischen Reaktionsprodukten der Cyclooxygenase bestehen, beispielsweise zwischen PGE₁, PGE₂ oder PGF_{2α} und dem Prostazyklin, was die Induktion der Osteoblastenproliferation bei Hemmung der Cyclooxygenase und gleichzeitiger Gabe von PGI₂ erklären könnte. Um einen solchen Effekt zu bestätigen, müssten in weiteren Studien verschiedene Cyclooxygenase-Produkte miteinander kombiniert werden, um gegensätzliche Einflüsse aufzuzeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer einzigen Iloprost-Konzentration auf MSCs aus humanem Knochenmark untersucht. Die alleinige Gabe von Iloprost schien die Proliferation der MSCs nicht zu fördern, in Kombination mit Indomethacin erhöhte sich die Zellzahl in den Versuchsreihen der Spender B und C. Möglicherweise könnten darüber hinaus gehende Einflüsse auf Proliferation und Differenzierung dieser Zellen in anderen Iloprost-Konzentrationen beobachtet werden.

4.3 Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Differenzierung von MSCs

4.3.1 Ergebniszusammenfassung

In dieser Arbeit konnte in den untersuchten Versuchsansätzen gezeigt werden, dass Indomethacin, Iloprost und die Kombination beider Substanzen Einfluss auf die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) aus humanem Knochenmark haben. Die aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen (MNCs) wurden mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von MSCs untersucht und es konnte bestätigt werden, dass es sich bei ca. 75% der MNCs um MSCs handelte. Unter den übrigen Zellen fanden sich eine CD45-positive Subpopulation sowie Monozyten und Leukozyten, welche nicht weiter subklassifiziert wurden.

Im Verlauf des Versuchs konnte unter Zugabe von Indomethacin und Iloprost eine Differenzierung in Osteoblasten nachgewiesen werden: Mittels RT-PCR wurde das Vorhandensein der osteoblastären Marker Alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC) und *runx-related transcription factor 2* (Runx2) bestätigt, der hämatopoetische Marker CD34 wurde nicht exprimiert. Es zeigte sich, dass CD45 leicht exprimiert wurde, was analog zur durchflusszytometrischen Analyse auf eine CD45-positive Subpopulation hinweist. Der mesenchymale Marker CD105 war in der RT-PCR in allen Versuchsansätzen deutlich nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine osteoblastäre Differenzierung der MSCs hin, bei einem weiterhin bestehenden Anteil an Progenitorzellen. Hierbei sei anzumerken, dass es sich bei der Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse um ein semiquantitatives Verfahren handelt, dessen Aussagekraft und Verwertbarkeit deutlich eingeschränkt sind. Eine durchflusszytometrische Messung des Anteils an CD105-positiven Zellen wurde allein zu Versuchsbeginn, jedoch nicht an den Versuchstagen 10 und 28 durchgeführt. Auf diese Quantifizierung des Anteils der mesenchymalen Zellen im Verlauf der Versuchsansätze wurde verzichtet, da die Messung der osteoblastentypischen intrazellulären Marker mittels Immunzytochemie und ALP-Assay im Vordergrund stand.

Die untersuchten Indomethacin-Konzentrationen 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M beeinflussten in dieser Arbeit die Differenzierung von MSCs in Osteoblasten: Betrachtet man die Ergebnisse der Immunzytochemie, so konnte mit steigender Indomethacinkonzentration eine Abnahme der Expression auf Proteinebene der osteoblastären Marker Runx2, Col1 und ALP gezeigt werden.

Besonders deutlich wurde dieser Effekt ab der Indomethacinkonzentration 10^{-4} M. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Indomethacin die osteoblastäre Differenzierung umso stärker unterdrückt, je höher die Konzentration ist.

Zur Bestimmung der spezifischen ALP-Aktivität wurden die Ergebnisse des ALP-Assays in Relation zur im BCA-Assay gemessenen Proteinkonzentration gesetzt. Im Gegensatz zum LDH zeigte sich jedoch im BCA-Assay mit steigender Indomethacin-Konzentration keine Verringerung des Proteingehalts der Zellen. Mit Dauer der Kultivierung nahm die Proteinkonzentration insgesamt zu, tendenziell ließen sich jedoch keine konzentrationsabhängigen Unterschiede an den Versuchstagen 10 und 28 feststellen.

Dagegen beeinflusste die Indomethacin-Konzentration die Aktivität der spezifischen ALP, wobei sich teilweise große Unterschiede zwischen den Ergebnissen in den Zellreihen der Spender ergaben. Bei einer Stichprobe von drei Spendern pro Versuchsansatz konnte keine gemeinsame Tendenz bezüglich des Einflusses der Indomethacinzugabe auf die spezifische ALP-Aktivität festgestellt werden. Eine größere Stichprobe könnte in folgenden Untersuchungen eine solche Tendenz klarer erkennbar machen (siehe auch Kapitel 4.5). Die Ergebnisse der spezifischen ALP-Aktivität sollten daher nur intraindividuell betrachtet werden: In den Versuchen von Spender A und B fiel auf, dass die Enzymaktivität an beiden Versuchstagen in der Indomethacin-Konzentration 10^{-6} M unterhalb der Kontrolle 0 lag, während die Ergebnisse mit 10^{-5} M in etwa denen der Kontrolle 0 entsprachen. Die Indomethacin-Konzentration 10^{-4} M führte in der Zellkultur von Spender A zu einem Aktivitätsanstieg der spezifischen ALP an Tag 10: und Tag 28, in der Zellkultur von Spender B jedoch zu einer verringerten Aktivität an beiden Kinetikpunkten.

Iloprost in der Konzentration 10^{-7} M steigerte in der Immunzytochemie die Expression der osteoblastären Marker Runx2 und Col1 und unterdrückte in Kombination mit Indomethacin den osteoinhibitorischen Transkriptionsfaktor Twist. Im BCA-Assay führte die Iloprost-Zugabe äquivalent zur Zellzahl zu einer gesteigerten Proteinkonzentration in allen Indomethacin-Konzentrationen.

Die spezifische ALP-Aktivität konnte durch alleinige Zugabe von Iloprost an Tag 28 in den Versuchsansätzen von Spender A und B gesteigert werden. In Kombination mit Indomethacin kam es zu deutlichen interindividuellen Unterschieden. So fiel beispielsweise die Enzymaktivität an Tag 10 in der Zellkultur Spender A mit 10^{-6} M+Ilo ab, stieg jedoch mit 10^{-4} M+Ilo wieder deutlich an.

In den Versuchsansätzen 10^{-6} M+Ilo, 10^{-5} M+Ilo und 10^{-4} M+Ilo der Zellkultur Spender B lagen alle Werte unterhalb der Kontrolle, was vermutlich auf die hohe Proteinkonzentration in diesen Ansätzen zurückzuführen ist und somit mathematisch zu einer geringeren spezifischen ALP-Aktivität führt.

4.3.2 Osteosuppressive Effekte von Indomethacin

Während der Effekt von Iloprost auf MSCs wenig erforscht ist, untersuchten mehrere Studien das Differenzierungspotenzial von MSCs unter dem Einfluss von Indomethacin.

Demnach regt Indomethacin *in vitro* die Adipogenese von MSCs an (Kelly und Gimble, 1998; Knight *et al*, 1987; Styner *et al*, 2010; Verrando *et al*, 1981; Williams und Polakis, 1977) und hat reziprok einen negativen Effekt auf die Osteogenese (Kang *et al*, 2007; Sen *et al*, 2008). Zwei Theorien über den Signaltransduktionsweg, der zu diesen Effekten führt, werden favorisiert:

Auf der einen Seite wird angenommen, dass die Unterdrückung der Prostaglandine zur Reduktion der osteoblastären Differenzierung beiträgt (Zhang *et al*, 2002), vor allem durch Verminderung von PGE₂ (Arikawa *et al*, 2004; Cheng *et al*, 1997; Choudhary *et al*, 2008), auf der anderen Seite könnte Indomethacin als Ligand für PPAR γ (*peroxysome proliferator-activated receptor gamma*) dienen und so die Transkription von Zielgenen der Adipogenese steigern (Lehmann *et al*, 1997). Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass unabhängig vom Transduktionsweg die Steigerung der Adipogenese zu einer Hemmung der Osteogenese führt (Zhang *et al*, 2008a). In einer Arbeit von 2010 stellten Styner *et al*. sowohl die Prostaglandin-, als auch die PPAR γ -vermittelte Adipogenese in Frage und favorisierten die Steigerung des Transkriptionsfaktors C/EBP β als Ursache der Indomethacin-induzierten Differenzierung von MSCs in Adipozyten. Sie konnten zeigen, dass der Zusatz von PGE₂ auf MSCs die adipogenen Effekte des Indomethacins nicht beeinflusste (Styner *et al*, 2010).

Einen Hinweis darauf, dass die Unterdrückung der Differenzierung von MSCs in Osteoblasten durch NSAIDs nicht auf einem Prostaglandin-abhängigen Mechanismus beruht, lieferten 2007 Chang *et al*. Sie untersuchten die Wirkung von Dexamethason, Celecoxib und Indomethacin auf murine und humane Knochenmarkstromazellen bezüglich der Proliferation, Zytotoxizität und Osteogenese und konnten zeigen, dass keines der verwendeten Antiphlogistika (u.a. Indomethacin) einen Einfluss auf die osteoblastäre Differenzierung, gemessen mittels ALP-Assay, erkennen ließ (Chang *et al*, 2007).

4.3.3 Wirkung von PGE₂ auf den Knochenstoffwechsel

Durch Verwendung von Indomethacin wurde in dieser Arbeit die Cyclooxygenase unspezifisch gehemmt und somit unter anderem die Synthese von PGE₂ unterdrückt. Dadurch wurden sämtliche Effekte des PGE₂ auf den Knochenstoffwechsel beeinflusst, die maßgeblich für die Osteogenese sind (Haversath *et al*, 2012).

In früheren *in vivo*-Studien ist der osteogene Einfluss von PGE₂ untersucht worden, allerdings mit zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen. Exogen zugeführtes PGE₂ zeigte sowohl stimulierende (Jee *et al*, 1985, 1990; Ke *et al*, 1992; Ueno *et al*, 1985) als auch inhibierende (Jee *et al*, 1985; Ke *et al*, 1992) Effekte auf den Knochenstoffwechsel der Ratte. Auch *in vitro* ergaben sich stimulierende (Nefussi und Baron, 1985; Raisz und Fall, 1990) und inhibierende (Nefussi und Baron, 1985; Okuda *et al*, 1989) Effekte von PGE₂ auf die Osteogenese. Neuere Studien zeigen, dass PGE₂ die osteoblastäre Differenzierung von MSCs aus dem Knochenmark über die Aktivierung der EP2- und EP4-Rezeptoren vermittelt (Blackwell *et al*, 2010), gefolgt von einer cAMP-abhängigen PKA-/MAPK-Signalkaskade, welche schließlich zu einer gesteigerten Expression von osteoblasten-assoziierten Transkriptionsfaktoren wie Runx2, Osterix und Dlx5 führt (Haversath *et al*, 2012). Bislang wurden in humanen Osteoblasten die funktionellen Prostaglandinrezeptoren EP2, EP4, IP, FP und TP identifiziert (Li *et al*, 2007; Sarrazin *et al*, 2001).

4.3.4 Wirkung von PGI₂ auf den Knochenstoffwechsel

PGI₂ wurde in dieser Studie in Form von Iloprost in einer Konzentration von 10⁻⁷ M zugegeben. In den Versuchsansätzen mit alleiniger Iloprostzugabe (0+Ilo) wurden diese 10⁻⁷ M PGI₂ somit von extern zu den Prostaglandinen der natürlichen Prostaglandinsynthese (PGI₂, PGE₂, PGF₂ und PGD₂) ergänzt. In den Versuchsansätzen mit einer Kombination aus Indomethacin und Iloprost wird die Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Cyclooxygenase durch Indomethacin unterdrückt und PGI₂ von extern zugegeben, sodass in der Theorie der Einfluss von PGI₂ auf die osteoblastäre Differenzierung im Vergleich zu den übrigen Prostaglandinen zunimmt. In der Immunzytochemie konnte unter Iloprostzugabe mit und ohne Indomethacin eine Zunahme der Runx2-Expression beobachtet werden. Die spezifische ALP-Aktivität konnte im Vergleich zur Kontrolle 0 durch alleinige Iloprostzugabe an Tag 28 in den Versuchsansätzen der Spender A und B gesteigert werden.

In der Literatur finden sich Hinweise über welche Mechanismen der Knochenstoffwechsel durch PGI₂ beeinflusst wird. Es wurde beschrieben, dass Prostazyklin die Knochenresorption und Osteoklastenaktivität von allen Prostaglandinen am effektivsten hemmt (Chambers *et al*, 1984; Fortier *et al*, 2001; Zaidi, 1990) und in MC3T3-E1-Osteoblasten die COX-Aktivität steigern kann, womit es entgegengesetzt zum Indomethacin zu wirken scheint (Sakuma *et al*, 2004).

Weiter zeigten Nakalekha *et al.* 2010 in einem *in vivo*-Modell, dass Prostazyklin in die Regulation des Knochenmetabolismus involviert ist. In PGI₂ *knockout*-Mäusen konnte anhand einer signifikant erhöhten Expression der knochenspezifischen Marker OC und C-terminalen Telopeptiden ein erhöhter Knochenumsatz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Nakalekha *et al.*, 2010). Die PGI₂-Produktion wird durch mechanischen Stress in Osteoblasten und Osteozyten induziert (Lanyon, 1992). Prostazyklin wirkt cAMP-abhängig über einen Proteinkinase A-Signalweg (cAMP/PKA) (Fortier *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 1982). Hohe cAMP-Spiegel sind mit anabolischem Knochenumbau verbunden und treten nach Stimulation von verschiedenen Prostaglandinrezeptoren, einschließlich IP, EP2 und EP4, auf (Hakeda *et al.*, 1986; Narumiya, 1995; Yokoyama *et al.*, 2013). Zudem führt ein cAMP-Anstieg in MC3T3-E1-Zellen zu einer verstärkten Expression des Protoonkogens c-fos, einem Bestandteil des Aktivatorproteins 1 (AP-1), welches die Expression von Col1, OC und ALP moduliert und somit die osteoblastäre Differenzierung fördert (Fitzgerald und Hughes-Fulford, 1999). Glantschnig *et al.* konnten erstmalig zeigen, dass Iloprost ein potenter Aktivator der c-fos Gentranskription ist und damit ein wirksamer Regulator der osteoblastären Proliferation und Differenzierung ist (Glantschnig *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise, dass nicht nur cAMP/PKA, sondern auch andere Signalkaskaden vom aktivierten IP-Rezeptor vermittelt werden, einschließlich eines Ca²⁺-Anstieges und der Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphonat (PIP₂) in die *second messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) (Namba *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1991).

4.3.5 Suppression von Twist unter einer Kombination von Indomethacin und Iloprost

Interessanterweise zeigte sich immunzytochemisch in den Versuchsansätzen mit beiden Medikamenten nicht nur eine gesteigerte Runx2-Expression, sondern auch eine Suppression von Twist. Noch bemerkenswerter ist, dass Iloprost ohne Indomethacin und wahrscheinlich im Zusammenspiel mit anderen Prostaglandinen die Twist-Expression im Vergleich zur Kontrolle steigerte.

Es gibt Hinweise, dass eine Überexpression von Twist die Genexpression von BMP-2, *bone sialoprotein* (BSP), Osteopontin (OP), ALP und OC in humanen MSCs verringert (Bialek *et al.*, 2004; Isenmann *et al.*, 2009). Schlussfolgernd ist eine Überexpression von Twist mit einer verminderten osteoblastären Differenzierung und gesteigerter Adipogenese assoziiert.

Darüber hinaus verlängert Twist die Lebensdauer von humanen MSCs und lässt einen unreifen stromalen Phenotyp persistieren (Isenmann *et al*, 2009). In murinen MSCs führte eine molekulare Abschaltung von Twist 1 zu einer gesteigerten osteoblastären Differenzierung (Miraoui *et al*, 2010) und es gibt Hinweise, dass Twist während früher Phasen der enchondralen und intramembranösen Knochenentwicklung herabreguliert wird (Alborzi *et al*, 1996). Bialek *et al*. berichteten in einer Studie an murinen Schädelkalotten, dass Twist nicht direkt die Expression von Runx2 beeinflusst, aber dessen DNA-Bindung über eine antiosteogene Domäne, die sogenannte Twist box, blockiert (Bialek *et al*, 2004).

Möglicherweise führen sich gegenseitig beeinflussende Prostaglandinrezeptor-vermittelte Signalkaskaden zu der gesteigerten Twist-Expression unter alleiniger Iloprostapplikation, vermutlich durch eine gesteigerte Stimulation des IP-Rezeptors und moderate oder geringe Stimulation anderer Prostaglandinrezeptoren.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, könnten Iloprost und Indomethacin gemeinsam die osteoblastäre Differenzierung durch eine Herabregulation von Twist und eine Hochregulation von Runx2 steigern. Allerdings konnte auch in Abwesenheit von Twist keine vermehrte Expression der osteoblastären Marker Col1, OC und ALP beobachtet werden.

4.3.6 Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die ALP-Expression und -Aktivität

In dieser Studie sank die ALP-Expression in der Immunzytochemie mit steigender Indomethacin-Konzentration an Tag 10 und 28 ab. Igarashi *et al*. fanden heraus, dass Indomethacin die ALP-Aktivität in MC3T3-E1-Osteoblasten bis zu Tag 15 steigerte und diese dann bis Tag 27 aufrecht blieb, wohingegen eine Kontrollgruppe nach Tag 15 einen Abfall der ALP-Aktivität aufwies (Igarashi *et al*, 1994). Auf verschiedenen Titanoberflächen führte Indomethacin in MC3T3-E1-Osteoblasten ebenfalls zu einer Abnahme der ALP-Aktivität (Dean *et al*, 2008). Andere Autoren fanden keine eindeutigen oder sogar fördernde Effekte von Indomethacin auf die ALP-Aktivität in derselben Zelllinie (Arpornmaeklong *et al*, 2008; Kajii *et al*, 1999).

In MSCs aus humanem Knochenmark fanden Chang *et al*. heraus, dass die ALP-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen NSAIDs (u.a. Indomethacin) nach einer Woche sank (Chang *et al*, 2007).

Die alleinige Zugabe von Iloprost führte in der vorliegenden Arbeit an Tag 28 zu einer Steigerung der Enzymaktivität in den MSCs der Spender A und B. Ho *et al.* fanden heraus, dass PGE₂ die ALP-Aktivität in frühen Osteoblasten (Tag 10) steigerte, jedoch nach 15 und 20 Tagen keinen Effekt mehr hervorrief (Ho *et al.*, 1999). Möglicherweise besitzt PGI₂ nach 28 Tagen einen größeren Einfluss auf die osteoblastäre Differenzierung von MSCs als PGE₂.

4.3.7 Einflüsse von Indomethacin und Iloprost auf die Expression von OC, Col1 und Runx2

Die Untersuchung der weiteren osteoblastären Marker ließ keinen eindeutigen Effekt von Indomethacin und Iloprost auf die Expression von OC erkennen, allerdings konnte eine moderate Suppression von Col1 an Tag 28 unter Zugabe von Indomethacin beobachtet werden. Chang *et al.* untersuchten den Einfluss von verschiedenen NSAIDs auf MSCs und fanden keine Veränderung der Expression von OC, Col1 und Runx2 in den ersten acht Tagen (Chang *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die frühe Expression von Runx2 durch Indomethacin nur geringfügig vermindert, OC und Col1 zeigten übereinstimmend mit Chang *et al.* dagegen keine Veränderung an Tag 10. Andere Autoren veröffentlichten ähnliche Ergebnisse in humanen MG-63 Osteosarkom-Zelllinien und in MC3T3-E1 Osteoblasten (Arpornmaeklong *et al.*, 2008; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2012).

4.4 Fazit

Die aktuelle Literatur deutet darauf hin, dass hohe Dosen von NSAIDs die Knochenneubildung beeinträchtigen und das osteogene Potenzial von MSCs hemmen. Es finden sich bislang jedoch keine Studien, in denen der Einfluss einer Substanzkombination von Indomethacin und Iloprost auf die Differenzierung von MSCs untersucht wurde. Eine Unterdrückung der Expression von Twist durch die Substanzkombination von Indomethacin und Iloprost ist bisher ebenfalls nicht beschrieben worden. Die intrazellulären Signalkaskaden, die diesen Effekt bewirken, könnten als Thema für weitere Untersuchungen dienen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein, dass NSAIDs die Expression von Runx2 verringern (Susperregui *et al*, 2011; Yoon *et al*, 2010). Sie stützen jedoch nicht uneingeschränkt die Annahme, dass die Unterdrückung der PGE₂-Produktion durch Indomethacin die Proliferation und die osteoblastäre Differenzierung von MSCs hemmt (Chang *et al*, 2007). Im CytoTox®96-Assay wurden bei Spender A und B zwar in höheren Indomethacinkonzentrationen weniger Zellen gemessen als in niedrigeren, allerdings lag die absolute Zellzahl in den Versuchsansätzen mit Indomethacin nicht unterhalb der Kontrollen. Im ALP-Assay lässt sich bei sehr unterschiedlichen Ergebnissen in den einzelnen Versuchsansätzen keine eindeutige Aussage zur spezifischen ALP-Aktivität treffen. Lediglich die alleinige Iloprostzugabe erhöhte die spezifische ALP-Aktivität bei Spender A und B an Tag 28 deutlich.

Die Applikation von Iloprost führt zu einer verstärkten Aktivierung des IP-Rezeptors in MSCs, wohingegen Indomethacin die Stimulation anderer Prostaglandinrezeptoren wie EP4 unterdrückt. Somit wurden in dieser Studie unter anderem isolierte Effekte von IP-Rezeptor-vermittelten Signalwegen in MSCs untersucht, mit gleichzeitiger Elimination anderer prostaglandinrezeptorabhängiger Effekte.

4.5 Einschränkungen der Studie

Aufgrund von geringen Zellzahlen in der Anzucht gelang es nicht, sämtliche Versuchsansätze mit den Zellen eines Spenders durchzuführen. Die fehlenden Versuchsansätze wurden mit Zellen anderer Spender ergänzt. In den Versuchsansätzen von Spender A und B fehlt jeweils eine Indomethacinkonzentration, von Spender C liegen die Versuchsansätze Kontrolle 0, 10⁻⁶ M+Ilo, 10⁻⁵ M+Ilo und 10⁻⁴ M+Ilo vor. Von den übrigen Spendern wurden jeweils ein (Spender E, F, G, H) oder zwei (Spender D) Versuchsansätze durchgeführt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Spender lassen sich Tendenzen nur aus den Ergebnissen der Spender A, B und mit Einschränkungen C ableiten. Der interindividuelle Vergleich ist bei diversen möglichen Einflussfaktoren, beispielsweise Alter und Geschlecht der Spender, unangebracht (Stolzing *et al*, 2008; Wagner *et al*, 2009).

Jede Medimentenkonzentration und –kombination wurde im Dreifachansatz untersucht. Eine Überinterpretation der statistischen Signifikanzen sollte vermieden werden, da diese aufgrund der kleinen Stichprobe von geringer statistischer Teststärke sind.

Zur Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse wäre eine Vergleichsstudie zur Untersuchung der Effekte von Indomethacin und Iloprost auf MSCs mit einer größeren Anzahl von Spendern sinnvoll.

In Anbetracht der vielen verschiedenen Spender mit teilweise gegensätzlichen Ergebnissen ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Im ALP-Assay lässt sich daher keine Aussage zum Einfluss von Indomethacin auf die spezifische ALP-Aktivität treffen. Dem gegenüber fielen die Ergebnisse der Immunzytochemie deutlich homogener aus, wobei hier angemerkt werden muss, dass es sich um eine semiquantitative Auswertung handelte.

Die Untersuchungen wurden an zwei Kinetikpunkten durchgeführt: Tag 10 für die frühe und Tag 28 die späte Differenzierung. Die Analyse von MSCs an Tag 28 ist übereinstimmend mit anderen Studien jedoch ein typischer Zeitpunkt (Håkeli *et al*, 2014; Walsh *et al*, 2001). Weitere Kinetikpunkte, beispielsweise alle 7 Tage, könnten das Verhalten der Zellen bezüglich Proliferation und Differenzierung genauer dokumentieren.

Weiterhin wurden die aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen nur auf die Oberflächenantigene CD14, CD45, CD73 und CD105 durchflusszytometrisch analysiert und erfüllten somit nicht die ISCT-Kriterien für MSCs (Dominici *et al*, 2006). Zum Zeitpunkt der Konzeption der Arbeit im Jahr 2007 flossen die ISCT-Kriterien noch nicht in die durchflusszytometrische Analyse ein. Die oben genannten Oberflächenantigene wurden zum damaligen Zeitpunkt als ausreichend betrachtet, um den mesenchymalen Charakter einer Zelle zu bestimmen.

4.6 Klinischer Ausblick

Iloprost wird in der Therapie des Knochenmarködems und in der Behandlung der avaskulären Osteonekrose eingesetzt (Aigner *et al*, 2005; Beckmann *et al*, 2013). Jäger *et al*. konnten zeigen, dass es in der Behandlung dieser Erkrankungen mit Iloprost zu verringerter Schmerzhaftigkeit anhand visueller Analogskalen sowie auch zu radiologisch nachgewiesener Befundbesserung kam (Jäger *et al*, 2008b). Ursächlich für diese Effekte scheint eine Reduktion eines durch Histamin und Serotonin verursachten mikrovaskulären Ödems durch Prostazyklin zu sein (Jäger *et al*, 2011b; Tillmann *et al*, 2007).

Eine Substanzkombination aus Indomethacin und Iloprost scheint in dieser Hinsicht durchaus sinnvoll, da postoperativ meist eine Schmerzmedikation indiziert ist und die Substanzklasse der NSAIDs darüber hinaus eine Prophylaxe der Heterotopen Ossifikation bietet, wobei Coxibe nicht-selektiven Cyclooxygenase-Hemmern aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils bei gleicher Wirksamkeit vorzuziehen sind (Grohs *et al*, 2007; van der Heide *et al*, 2007; Tsailas *et al*, 2009).

Die zusätzliche Gabe von Iloprost könnte bei Patienten mit Endoprothesenimplantation durch eine Steigerung der Zellproliferation und Expression von Protein die Rate an Revisionen senken und zusätzliche Schmerzlinderung bringen. Inwiefern Patienten dadurch profitierten, müsste in klinischen Studien anhand von Schmerzskaleten und radiologischen Verfahren weiter untersucht werden.

Iloprost wird in der klinischen Anwendung zur Steigerung der Gewebedurchblutung durch eine Dilatation von Arteriolen und Venolen eingesetzt, welche auf einem cAMP-Anstieg in glatten Muskelzellen beruht (Olschewski *et al*, 2002; Pfitzer, 2001). Parfenova *et al*. untersuchten den Einfluss von Indomethacin und Iloprost auf die Dilatation der Pialarterien von neugeborenen Schweinen um die Hypothese zu prüfen, dass Indomethacin die Wirkung von Prostazyklin nicht nur über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese, sondern auch durch direkte Inhibition der Prostazyklinrezeptor-vermittelten Vasodilatation beeinflusst. Sie konnten zeigen, dass die topische Applikation von Iloprost (2×10^{-8} M) eine konzentrationsabhängige Vasodilatation hervorrief mit entsprechendem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Indomethacin in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht (KG) intravenös (i.v.) und 10^{-4} M topisch reduzierte sowohl die Vasodilatation als auch den cAMP-Spiegel deutlich. Dem gegenüber veränderte die Gabe von Aspirin (50 mg/kg KG i.v. und 10^{-3} M topisch) weder die Vasodilatation noch den cAMP-Spiegel (Parfenova *et al*, 1995).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Indomethacin vasodilatatorische Effekte von Iloprost nicht nur über eine reine Hemmung der Prostaglandinsynthese, sondern auch über eine direkte Beeinflussung der Prostazyklinrezeptor-vermittelten Vasodilatation, vermindert (Parfenova *et al*, 1995). Inwiefern eine höhere Iloprostkonzentration in der Lage ist, die Durchblutung unter Verwendung von Indomethacin weiterhin zu steigern, ist nicht untersucht worden und könnte als Ansatz für weitere Studien dienen.

5 Schlussfolgerungen

Es konnten in dieser *in vitro*-Studie die bekannten inhibierenden Effekte von Indomethacin auf die Proliferation mesenchymaler Stromazellen nur teilweise bestätigt werden (Spender A Tag 10, Spender B Tag 10 und 28). Demgegenüber reagierte die Zellreihe von Spender A durch Indomethacinzugabe an Tag 28 mit einer Zellzahlsteigerung. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte vor allem unter Zugabe von Iloprost an Versuchstag 28 festgestellt werden, sodass eine höhere Indomethacin-Konzentration stärkere inhibierende Effekte auf die Proliferation zu besitzen scheint als niedrigere Konzentrationen. In Hinblick auf die Zelldifferenzierung fielen noch stärkere Schwankungen unter den Zellreihen auf. Insgesamt lag die spezifische ALP-Aktivität in den mit Indomethacin beimpften MSCs leicht unter der Kontrolle, auch schien Indomethacin die Expression von Runx2 in der Konzentration 10^{-4} M zu hemmen.

Erstmalig wurde der Effekt einer Kombination von Indomethacin und dem Prostazyklinanalogon Iloprost auf MSCs aus humanem Knochenmark untersucht. Die Zugabe von Iloprost führte zumindest in den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M zu einer Steigerung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt trat nur in der Substanzkombination und nicht unter alleiniger Iloprostgabe auf. Im Gegensatz dazu bewirkte Iloprost alleine eine gesteigerte osteoblastäre Zelldifferenzierung. In Kombination mit Indomethacin konnte dieser Effekt insgesamt nicht nachgewiesen werden. Unklar bleibt, über welchen molekularen Mechanismus Iloprost diese Effekte erzielen kann. Möglicherweise verhalten sich verschiedene Prostaglandine (z.B. PGE_2) antagonistisch zu PGI_2 , sodass eine proliferationssteigernde Wirkung mit Iloprost erst durch nicht-selektive Unterdrückung der Prostaglandinsynthese mittels Indomethacin erzielt werden könnte.

In dieser Arbeit fiel immunzytochemisch auf, dass der osteoblasteninhibierenden Transkriptionsfaktor Twist in der Kombination von Indomethacin und Iloprost nicht mehr exprimiert wurde. Dieser Effekt ist bisher nicht vorbeschrieben und könnte eine entscheidende Rolle in der osteoblastären Differenzierung von MSCs unter Anwendung einer Substanzkombination von Indomethacin und Iloprost spielen.

Es wurden in dieser *in vitro*-Studie die Effekte der Iloprost-Konzentration 10^{-7} M untersucht. Inwieweit andere Prostazyklin-Konzentrationen Zellproliferation und -differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen beeinflussen, bleibt ungeklärt.

6 Zusammenfassung

Indomethacin wird sowohl zur Prophylaxe der Heterotopen Ossifikation (HO) als auch zur postoperativen Schmerztherapie eingesetzt. In verschiedenen klinischen Studien wurde eine signifikante Reduktion von HO nach Hüftendoprothesenimplantation durch die prophylaktische perioperative Gabe von Cyclooxygenase-Inhibitoren nachgewiesen. Dem gegenüber mehren sich die Hinweise, dass das Prostazyklin-Analogon Iloprost ein regenerativ-kuratives Potenzial bei avaskulären Osteonekrosen in Frühstadien besitzt. In dieser Arbeit wurde im *in-vitro*-Modell die Wirkung des nichtselektiven Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin auf die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) aus humanem Knochenmark in Osteoblasten untersucht, sowie die potenzielle Beeinflussung durch Iloprost. Knochenmarkzellen acht gesunder Spender wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert, expandiert und ihr mesenchymaler Charakter mittels Durchflusszytometrie kontrolliert, über 28 Tage ohne Dexamethason-Ascorbinsäure- β -Glycerolphosphat-Stimulation (DAG) wie folgt kultiviert: Ohne Indomethacin als Kontrolle, allein mit 10^{-7} M Iloprost, mit 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M Indomethacin mit und ohne Zusatz von 10^{-7} M Iloprost. Nach 10 und 28 Tagen wurden die Zellproliferation, die Proteinkonzentration und die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen. Die osteoblastäre Differenzierung wurde auf der Expressionsebene über Ribonukleinsäureisolation und Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) sowie auf der Proteinebene mittels Immunzytochemie auf die Marker Runx2, Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), Alkalische Phosphatase (ALP) sowie den osteoblasten-inhibitorischen Transkriptionsfaktor Twist untersucht. Es zeigte sich, dass Twist unter der Kombination von Indomethacin und Iloprost nicht mehr exprimiert wurde; ein Effekt, der bisher nicht beschrieben worden ist. Weiter unterdrückte Indomethacin die osteoblastären Marker Col1, Runx2, und OC in der Immunzytochemie, Iloprost führte zu einer Steigerung der Expression von Runx2. Die spezifische ALP-Aktivität stieg unter alleiniger Iloprostgabe an Tag 28 an, die Versuchsansätze mit Indomethacin zeigten hier sehr unterschiedliche Ergebnisse unter den Spendern. Die Proliferation der MSCs konnte durch das Prostazyklin-Analogon in einigen Zellreihen gesteigert werden. Osteoproliferative Effekte der Kombination von Indomethacin und Iloprost könnten durch die Suppression von Twist begünstigt werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Adkins S, Burmeister M (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* **240**: 17–23.
- 2 Aigner N, Petje G, Schneider W, Meizer R, Wlk M, Kotsaris S, *et al* (2005). Bone marrow edema syndrome of the femoral head: treatment with the prostacyclin analogue iloprost vs. core decompression: an MRI-controlled study. *Wien Klin Wochenschr* **117**: 130–135.
- 3 Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. (Elsevier Urban & Fischer: München, 2005).* .
- 4 Alborzi A, Mac K, Glackin CA, Murray SS, Zernik JH (1996). Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. *J Craniofac Genet Dev Biol* **16**: 94–106.
- 5 Alexander CM, Puchalski J, Klos KS, Badders N, Ailles L, Kim CF, *et al* (2009). Separating stem cells by flow cytometry: reducing variability for solid tissues. *Cell Stem Cell* **5**: 579–583.
- 6 Alhadlaq A, Mao JJ (2003). Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* **82**: 951–956.
- 7 Alhadlaq A, Mao JJ (2004). Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* **13**: 436–448.
- 8 Alhadlaq A, Mao JJ (2005). Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Joint Surg Am* **87**: 936–944.
- 9 Arikawa T, Omura K, Morita I (2004). Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **200**: 400–406.
- 10 Arita NA, Pelaez D, Cheung HS (2011). Activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) is needed for the TGF β -induced chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **405**: 564–

569.

11 Arpornmaeklong P, Akarawatcharapura B, Pripatnanont P (2008). Factors influencing effects of specific COX-2 inhibitor NSAIDs on growth and differentiation of mouse osteoblasts on titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* **23**: 1071–1081.

12 Aubin JE (1998). Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 73–82.

13 Balint E, Lapointe D, Drissi H, Meijden C van der, Young DW, Wijnen AJ van, *et al* (2003). Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **89**: 401–426.

14 Baltimore D (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**: 1209–1211.

15 Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* **28**: 707–715.

16 Banovac K, Gonzalez F (1997). Evaluation and management of heterotopic ossification in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* **35**: 158–162.

17 Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014). Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells* **32**: 1713–1723.

18 Barry FP, Murphy JM (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 568–584.

19 Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I, Hojak S, *et al* (2007). Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* **75**: 279–291.

20 Beckmann J, Schmidt T, Schaumburger J, Rath B, Lüring C, Tingart M, *et al* (2013). Infusion, core decompression, or infusion following core decompression in the treatment of bone edema syndrome and early avascular osteonecrosis of the femoral head. *Rheumatol Int* **33**: 1561–1565.

21 Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F (2012). Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant* **47**: 164–171.

22 Bertolini A, Ottani A, Sandrini M (2001). Dual acting anti-inflammatory drugs: a

reappraisal. *Pharmacol Res* **44**: 437–450.

23 Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, *et al* (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* **6**: 423–435.

24 Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC (2010). Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* **21**: 294–301.

25 Bosse MJ, Poka A, Reinert CM, Ellwanger F, Slawson R, McDevitt ER (1988). Heterotopic ossification as a complication of acetabular fracture. Prophylaxis with low-dose irradiation. *J Bone Joint Surg Am* **70**: 1231–1237.

26 Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR (2008). Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res* **39**: 467–482.

27 Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH Jr (1973). Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* **55**: 1629–1632.

28 Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* **64**: 278–294.

29 Bruedigam C, Driel M van, Koedam M, Peppel J van de, Eerden BCJ van der, Eijken M, *et al* (2011). Basic techniques in human mesenchymal stem cell cultures: differentiation into osteogenic and adipogenic lineages, genetic perturbations, and phenotypic analyses. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 1**: Unit1H.3.

Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T (2005). Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol* **56 Suppl 5**: 33–55.

30 Butler M, Spearman M, Braasch K (2014). Monitoring cell growth, viability, and apoptosis. *Methods Mol Biol* **1104**: 169–192.

31 Caers J, Peymen K, Suetens N, Temmerman L, Janssen T, Schoofs L, *et al* (2014). Characterization of G Protein-coupled Receptors by a Fluorescence-based Calcium Mobilization Assay. *J Vis Exp* doi:10.3791/51516.

32 Cahlin C, Gelin J, Delbro D, Lönnroth C, Doi C, Lundholm K (2000). Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with and without cancer cachexia related to prostanoids. *Cancer Res* **60**: 1742–1749.

- 33 Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**: 641–650.
- 34 Capulli M, Paone R, Rucci N (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.
- 35 Chambers TJ, Fuller K, Athanasou NA (1984). The effect of prostaglandins I₂, E₁, E₂ and dibutyl cyclic AMP on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. *Br J Exp Pathol* **65**: 557–566.
- 36 Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L (2009). Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* **258**: 148–156.
- 37 Chang J-K, Li C-J, Wu S-C, Yeh C-H, Chen C-H, Fu Y-C, *et al* (2007). Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol* **74**: 1371–1382.
- 38 Chang J-K, Wang G-J, Tsai S-T, Ho M-L (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drug effects on osteoblastic cell cycle, cytotoxicity, and cell death. *Connect Tissue Res* **46**: 200–210.
- 39 Chattopadhyay PK, Perfetto SP, Roederer M (2004). The colorful future of cell analysis by flow cytometry. *Discov Med* **4**: 255–262.
- 40 Cheng MZ, Zaman G, Rawlinson SC, Pitsillides AA, Suswillo RF, Lanyon LE (1997). Enhancement by sex hormones of the osteoregulatory effects of mechanical loading and prostaglandins in explants of rat ulnae. *J Bone Miner Res* **12**: 1424–1430.
- 41 Choudhary S, Alander C, Zhan P, Gao Q, Pilbeam C, Raisz L (2008). Effect of deletion of the prostaglandin EP₂ receptor on the anabolic response to prostaglandin E₂ and a selective EP₂ receptor agonist. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **86**: 35–40.
- 42 Daley GQ (2012). The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* **10**: 740–749.
- 43 Darius H, Hossmann V, Schrör K (1986). Antiplatelet effects of intravenous iloprost in patients with peripheral arterial obliterative disease. A placebo-controlled dose-response study. *Klin Wochenschr* **64**: 545–551.
- 44 Dayoub H, Dumont RJ, Li JZ, Dumont AS, Hankins GR, Kallmes DF, *et al* (2003). Human mesenchymal stem cells transduced with recombinant bone morphogenetic protein-9 adenovirus promote osteogenesis in rodents. *Tissue Eng* **9**: 347–356.

- 45 Dean DD, Campbell CM, Gruwell SF, Tindall JWM, Chuang H-H, Zhong W, *et al* (2008). Arachidonic acid and prostaglandin E2 influence human osteoblast (MG63) response to titanium surface roughness. *J Oral Implantol* **34**: 303–312.
- 46 DeLee J, Ferrari A, Charnley J (1976). Ectopic bone formation following low friction arthroplasty of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 53–59.
- 47 Deregowski V, Gazzerri E, Priest L, Rydziel S, Canalis E (2006). Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* **281**: 6203–6210.
- 48 Derubeis AR, Cancedda R (2004). Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* **32**: 160–165.
- 49 Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, Morales MA-, Rodríguez-Pérez L, Rubio-Ruiz B, Ruiz C (2012). Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biol Res Nurs* **14**: 98–107.
- 50 Dibble JB, Kalra PA, Orchard MA, Turney JH, Davies JA (1988). Prostacyclin and iloprost do not affect action of standard dose heparin on haemostatic function during haemodialysis. *Thromb Res* **49**: 385–392.
- 51 DiCesare PE, Nimni ME, Peng L, Yazdi M, Cheung DT (1991). Effects of indomethacin on demineralized bone-induced heterotopic ossification in the rat. *J Orthop Res* **9**: 855–861.
- 52 Dijke P ten, Krause C, Gorter DJJ de, Löwik CWGM, Bezooijen RL van (2008). Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* **90 Suppl 1**: 31–35.
- 53 Dittrich W, Göhde W Flow-through Chamber for Photometers to Measure and Count Particles in a Dispersion Medium. *DE1815352; US3761187* .
- 54 Dogné JM, Leval X de, Delarge J, David JL, Masereel B (2000). New trends in thromboxane and prostacyclin modulators. *Curr Med Chem* **7**: 609–628.
- 55 Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al* (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315–317.
- 56 Dormandy JA (1996). Prostanoid drug therapy for peripheral arterial occlusive disease--the European experience. *Vasc Med* **1**: 155–158.
- 57 Dykes IM, Lanier J, Eng SR, Turner EE (2010). Brn3a regulates neuronal subtype

specification in the trigeminal ganglion by promoting Runx expression during sensory differentiation. *Neural Dev* **5**: 3.

58 Ehebauer M, Hayward P, Arias AM (2006). Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. *Science* **314**: 1414–1415.

59 Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, *et al* (2007). The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J* **21**: 2949–2960.

60 Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, *et al* (2008). Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* **14**: 299–305.

61 Fachinformation Ilomedin® 20/50 (2010). Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz® Ilomedin® 20/50. .

62 Fetalvero KM, Shyu M, Nomikos AP, Chiu Y-F, Wagner RJ, Powell RJ, *et al* (2006). The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**: H1337–1346.

63 Firoozabadi R, O'Mara TJ, Swenson A, Agel J, Beck JD, Routt M (2014). Risk Factors for the Development of Heterotopic Ossification After Acetabular Fracture Fixation. *Clin Orthop Relat Res* doi:10.1007/s11999-014-3719-2.

64 Fitscha P, Tiso B, Krais T, Sinzinger H (1987a). Effect of iloprost on in vivo and in vitro platelet function in patients with peripheral vascular disease (PVD). *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **17A**: 450–454.

65 Fitscha P, Tiso B, Sinzinger H (1987b). Iloprost in peripheral vascular disease--platelet function and clinical outcome. *Prog Clin Biol Res* **242**: 463–468.

66 Fitzgerald J, Hughes-Fulford M (1999). Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. *FASEB J* **13**: 553–557.

67 Fitzpatrick FA (2004). Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* **10**: 577–588.

68 Fortier I, Patry C, Lora M, Samadfan R, Brum-Fernandes AJ de (2001). Immunohistochemical localization of the prostacyclin receptor (IP) human bone. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **65**: 79–83.

69 Fracon RN, Teófilo JM, Satin RB, Lamano T (2008). Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J Oral Sci* **50**: 247–252.

- 70 Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235**: 176–190.
- 71 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **3**: 393–403.
- 72 Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, *et al* (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**: 83–92.
- 73 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**: 267–274.
- 74 Friedman MS, Long MW, Hankenson KD (2006). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* **98**: 538–554.
- 75 Fulwyler MJ (1965). Electronic separation of biological cells by volume. *Science* **150**: 910–911.
- 76 Glantschnig H, Varga F, Rumpler M, Klaushofer K (1996). Prostacyclin (PGI₂): a potential mediator of c-fos expression induced by hydrostatic pressure in osteoblastic cells. *Eur J Clin Invest* **26**: 544–548.
- 77 Glass DA 2nd, Karsenty G (2006). Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol* **73**: 43–84.
- 78 Gonda K, Nakaoka T, Yoshimura K, Otawara-Hamamoto Y, Harrii K (2000). Heterotopic ossification of degenerating rat skeletal muscle induced by adenovirus-mediated transfer of bone morphogenetic protein-2 gene. *J Bone Miner Res* **15**: 1056–1065.
- 79 Gorman RR, Bunting S, Miller OV (1977). Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins* **13**: 377–388.
- 80 Graham S, Gamie Z, Polyzois I, Narvani AA, Tzafetta K, Tsiridis E, *et al* (2009). Prostaglandin EP2 and EP4 receptor agonists in bone formation and bone healing: In vivo and in vitro evidence. *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 746–766.
- 81 Grant SM, Goa KL (1992). Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs* **43**: 889–924.

- 82 Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, *et al* (2005). How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* **1049**: 97–106.
- 83 Griffin M, Iqbal SA, Bayat A (2011). Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br* **93**: 427–434.
- 84 Grohs JG, Schmidt M, Wanivenhaus A (2007). Selective COX-2 inhibitor versus indomethacin for the prevention of heterotopic ossification after hip replacement: a double-blind randomized trial of 100 patients with 1-year follow-up. *Acta Orthop* **78**: 95–98.
- 85 Gryglewski RJ (2008). Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* **60**: 3–11.
- 86 Hakeda Y, Yoshino T, Natakani Y, Kurihara N, Maeda N, Kumegawa M (1986). Prostaglandin E2 stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *J Cell Physiol* **128**: 155–161.
- 87 Håkelién A-M, Bryne JC, Harstad KG, Lorenz S, Paulsen J, Sun J, *et al* (2014). The regulatory landscape of osteogenic differentiation. *Stem Cells* **32**: 2780–2793.
- 88 Hartke JR, Lundy MW (2001). Bone anabolic therapy with selective prostaglandin analogs. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**: 25–31.
- 89 Haurand M, Flohé L (1989). Leukotriene formation by human polymorphonuclear leukocytes from endogenous arachidonate. Physiological triggers and modulation by prostanoids. *Biochem Pharmacol* **38**: 2129–2137.
- 90 Haversath M, Catelas I, Li X, Tassemeier T, Jäger M (2012). PGE₂ and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways. *Can J Physiol Pharmacol* **90**: 1434–1445.
- 91 Heide HJL van der, Rijnberg WJ, Sorge A Van, Kampen A Van, Schreurs BW (2007). Similar effects of rofecoxib and indomethacin on the incidence of heterotopic ossification after hip arthroplasty. *Acta Orthop* **78**: 90–94.
- 92 Helliwell RJA, Adams LF, Mitchell MD (2004). Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**: 101–113.
- 93 Hengwei Z LX Ubiquitin E3 Ligase Itch Negatively Regulates Osteoblast Differentiation from Mesenchymal Progenitor Cells. *Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14642*,

USA .

94 Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, *et al* (2008). Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* **14**: 306–314.

95 Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD (2009). In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol* **57**: 318–323.

96 Hoepfer MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J, *et al* (2000). Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* **342**: 1866–1870.

97 Ho ML, Chang JK, Chuang LY, Hsu HK, Wang GJ (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem Pharmacol* **58**: 983–990.

98 Honjo T (1996). The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. *Genes Cells* **1**: 1–9.

99 Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, *et al* (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8932–8937.

100 Huang Q, Fu W-L (2005). Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* **43**: 841–842.

101 Hurlbut GD, Kankel MW, Lake RJ, Artavanis-Tsakonas S (2007). Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 166–175.

102 Id Boufker H, Lagneaux L, Najar M, Piccart M, Ghanem G, Body J-J, *et al* (2010). The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *BMC Cancer* **10**: 298.

103 Igarashi K, Hirafuji M, Adachi H, Shinoda H, Mitani H (1994). Role of endogenous PGE2 in osteoblastic functions of a clonal osteoblast-like cell, MC3T3-E1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **50**: 169–172.

104 Iino S (1995). [Clinical significance of alkaline phosphatase isozyme analysis]. *Nippon Rinsho* **53**: 1157–1161.

- 105 Im G-I, Shin Y-W, Lee K-B (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthr Cartil* **13**: 845–853.
- 106 In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings GMJS de, Claas FHJ, Fibbe WE, *et al* (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**: 1338–1345.
- 107 Isenmann S, Arthur A, Zannettino ACW, Turner JL, Shi S, Glackin CA, *et al* (2009). TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells* **27**: 2457–2468.
- 108 Jäger M, Fischer J, Dohrn W, Li X, Ayers DC, Czibere A, *et al* (2008a). Dexamethasone modulates BMP-2 effects on mesenchymal stem cells in vitro. *J Orthop Res* **26**: 1440–1448.
- 109 Jäger M, Herten M, Fochtmann U, Fischer J, Hernigou P, Zilkens C, *et al* (2011a). Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res* **29**: 173–180.
- 110 Jäger M, Tillmann FP, Thornhill TS, Mahmoudi M, Blondin D, Hetzel GR, *et al* (2008b). Rationale for prostaglandin I₂ in bone marrow oedema--from theory to application. *Arthritis Res Ther* **10**: R120.
- 111 Jäger M, Zilkens C, Bittersohl B, Matheney T, Kozina G, Blondin D, *et al* (2011b). Efficiency of iloprost treatment for osseous malperfusion. *Int Orthop* **35**: 761–765.
- 112 Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**: 295–312.
- 113 Jee WS, Mori S, Li XJ, Chan S (1990). Prostaglandin E₂ enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone* **11**: 253–266.
- 114 Jee WS, Ueno K, Deng YP, Woodbury DM (1985). The effects of prostaglandin E₂ in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif Tissue Int* **37**: 148–157.
- 115 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**: 41–49.

- 116 Jin U-H, Suh S-J, Park S-D, Kim K-S, Kwon DY, Kim C-H (2008). Inhibition of mouse osteoblast proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae). *Food Chem Toxicol* **46**: 2135–2142.
- 117 Johnson EJ, Mackie IJ, Machin SJ, Brozović B (1984). Preservation of platelet function in cryopreserved platelet concentrates with prostacyclin. *Clin Lab Haematol* **6**: 141–144.
- 118 Kajii T, Suzuki K, Yoshikawa M, Imai T, Matsumoto A, Nakamura S (1999). Long-term effects of prostaglandin E2 on the mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* **44**: 233–241.
- 119 Kamolratanakul P, Hayata T, Ezura Y, Kawamata A, Hayashi C, Yamamoto Y, *et al* (2011). Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice. *Arthritis Rheum* **63**: 1021–1033.
- 120 Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA (2007). Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **282**: 14515–14524.
- 121 Kastrinaki M-C, Andreakou I, Charbord P, Papadaki HA (2008). Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers: comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Eng Part C Methods* **14**: 333–339.
- 122 Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* 36–46.
- 123 Kawai S (1998). Cyclooxygenase selectivity and the risk of gastro-intestinal complications of various non-steroidal anti-inflammatory drugs: a clinical consideration. *Inflamm Res* **47 Suppl 2**: S102–106.
- 124 Ke HZ, Jee WS, Mori S, Li XJ, Kimmel DB (1992). Effects of long-term daily administration of prostaglandin-E2 on maintaining elevated proximal tibial metaphyseal cancellous bone mass in male rats. *Calcif Tissue Int* **50**: 245–252.
- 125 Keller J, Bayer-Kristensen I, Bak B, Bünger C, Kjaersgaard-Andersen P, Lucht U, *et al* (1989). Indomethacin and bone remodeling. Effect on cortical bone after osteotomy in rabbits. *Acta Orthop Scand* **60**: 119–121.
- 126 Kelly KA, Gimble JM (1998). 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte

differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology* **139**: 2622–2628.

127 Knaus P, Sebald W (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* **382**: 1189–1195.

128 Knight DM, Chapman AB, Navre M, Drinkwater L, Bruno JJ, Ringold GM (1987). Requirements for triggering of adipocyte differentiation by glucocorticoids and indomethacin. *Mol Endocrinol* **1**: 36–43.

129 Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, *et al* (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* **200**: 123–135.

130 Komaki M, Karakida T, Abe M, Oida S, Mimori K, Iwasaki K, *et al* (2007). Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem* **100**: 303–314.

131 Komori T (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* **99**: 1233–1239.

132 Krause W, Kraus T (1986). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. *Eur J Clin Pharmacol* **30**: 61–68.

133 Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* **116**: 1202–1209.

134 Lam K, Zhang D-E (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 1120–1139.

135 Lanyon LE (1992). Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res* **7 Suppl 2**: S369–375.

136 Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, *et al* (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* **20**: 8783–8792.

137 Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272**: 3406–3410.

138 Li D, Liu H, Li Y, Yang M, Qu C, Zhang Y, *et al* (2014). Identification of suitable endogenous control genes for quantitative RT-PCR analysis of miRNA in bovine solid

tissues. *Mol Biol Rep* doi:10.1007/s11033-014-3530-x.

139 Li M, Thompson DD, Paralkar VM (2007). Prostaglandin E(2) receptors in bone formation. *Int Orthop* **31**: 767–772.

140 Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, *et al* (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* **280**: 19883–19887.

141 Long MW (2001). Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis* **27**: 677–690.

142 Luther G, Wagner ER, Zhu G, Kang Q, Luo Q, Lamplot J, *et al* (2011). BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. *Curr Gene Ther* **11**: 229–240.

143 Malatesta M, Zancanaro C, Costanzo M, Cisterna B, Pellicciari C (2013). Simultaneous ultrastructural analysis of fluorochrome-photoconverted diaminobenzidine and gold immunolabelling in cultured cells. *Eur J Histochem* **57**: e26.

144 Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* **3**: 248–269.

145 Manokawinchoke J, Pimkhaokhum A, Everts V, Pavasant P (2014). Prostaglandin E2 inhibits in-vitro mineral deposition by human periodontal ligament cells via modulating the expression of TWIST1 and RUNX2. *J Periodont Res* doi:10.1111/jre.12162.

146 Marion NW, Mao JJ (2006). Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Meth Enzymol* **420**: 339–361.

147 Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, *et al* (2003). Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **4**: 158–161.

148 McCarthy TL, Centrella M (2010). Novel links among Wnt and TGF-beta signaling and Runx2. *Mol Endocrinol* **24**: 587–597.

149 McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, Hess DM, Rich S (1999). Compassionate use of continuous prostacyclin in the management of secondary pulmonary hypertension: a case series. *Ann Intern Med* **130**: 740–743.

150 Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, *et al* (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**: 829–834.

- 151 Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, Aubin JE, Maeda N (2009). EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone* **44**: 1177–1185.
- 152 Miraoui H, Marie PJ (2010). Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* **468**: 1–7.
- 153 Miraoui H, Severe N, Vaudin P, Pagès J-C, Marie PJ (2010). Molecular silencing of Twist1 enhances osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells: implication of FGFR2 signaling. *J Cell Biochem* **110**: 1147–1154.
- 154 Mittag M, Beckheinrich P, Haustein UF (2001). Systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon: effects of iloprost infusion therapy on serum cytokine, growth factor and soluble adhesion molecule levels. *Acta Derm Venereol* **81**: 294–297.
- 155 Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y (2000). Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2 β 1 integrin interaction. *J Cell Physiol* **184**: 207–213.
- 156 Moed BR, Letournel E (1994). Low-dose irradiation and indomethacin prevent heterotopic ossification after acetabular fracture surgery. *J Bone Joint Surg Br* **76**: 895–900.
- 157 Moed BR, Maxey JW (1993). The effect of indomethacin on heterotopic ossification following acetabular fracture surgery. *J Orthop Trauma* **7**: 33–38.
- 158 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17–27.
- 159 Naik AA, Xie C, Zuscik MJ, Kingsley P, Schwarz EM, Awad H, *et al* (2009). Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *J Bone Miner Res* **24**: 251–264.
- 160 Nakagawa K, Imai Y, Ohta Y, Takaoka K (2007). Prostaglandin E2 EP4 agonist (ONO-4819) accelerates BMP-induced osteoblastic differentiation. *Bone* **41**: 543–548.
- 161 Nakalekha C, Yokoyama C, Miura H, Alles N, Aoki K, Ohya K, *et al* (2010). Increased bone mass in adult prostacyclin-deficient mice. *J Endocrinol* **204**: 125–133.
- 162 Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, *et al* (1994). cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* **269**: 9986–9992.

- 163 Naraghi FF, DeCoster TA, Moneim MS, Miller RA, Rivero D (1996). Heterotopic ossification. *Orthopedics* **19**: 145–151.
- 164 Narumiya S (1995). Structures, properties and distributions of prostanoid receptors. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**: 17–22.
- 165 Nefussi JR, Baron R (1985). PGE₂ stimulates both resorption and formation of bone in vitro: differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *Anat Rec* **211**: 9–16.
- 166 Neumann E, Schett G (2007). [Bone metabolism: molecular mechanisms]. *Z Rheumatol* **66**: 286–289.
- 167 Nilsson OS, Bauer HC, Brosjö O, Törnkvist H (1986). Influence of indomethacin on induced heterotopic bone formation in rats. Importance of length of treatment and of age. *Clin Orthop Relat Res* 239–245.
- 168 Noda M, Camilliere JJ (1989). In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* **124**: 2991–2994.
- 169 Ohata Y, Ozono K (2014). [Bone and Stem Cells. The mechanism of osteogenic differentiation from mesenchymal stem cell]. *Clin Calcium* **24**: 501–508.
- 170 O’Keefe RJ, Tiyyapatanaputi P, Xie C, Li TF, Clark C, Zuscik MJ, *et al* (2006). COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts. *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 532–542.
- 171 Okuda A, Taylor LM, Heersche JN (1989). Prostaglandin E₂ initially inhibits and then stimulates bone resorption in isolated rabbit osteoclast cultures. *Bone Miner* **7**: 255–266.
- 172 Olschewski H (2009). Inhaled iloprost for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* **18**: 29–34.
- 173 Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, *et al* (2002). Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **347**: 322–329.
- 174 Omori K, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T (2014). Multiple roles of prostaglandin E₂ -EP signal in vascular permeability. *Br J Pharmacol* doi:10.1111/bph.12815.
- 175 Ong SH, Horne D, Yeung CK, Nickolls P, Cole T (1987). Development of an imaging flow cytometer. *Anal Quant Cytol Histol* **9**: 375–382.
- 176 Osyczka AM, Nöth U, O’Connor J, Caterson EJ, Yoon K, Danielson KG, *et al* (2002). Multilineage differentiation of adult human bone marrow progenitor cells transduced with

- human papilloma virus type 16 E6/E7 genes. *Calcif Tissue Int* **71**: 447–458.
- 177 Owen M, Friedenstien AJ (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**: 42–60.
- 178 Palumbo C, Palazzini S, Marotti G (1990). Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* **11**: 401–406.
- 179 Paralkar VM, Borovecki F, Ke HZ, Cameron KO, Lefker B, Grasser WA, *et al* (2003). An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6736–6740.
- 180 Parfenova H, Zuckerman S, Leffler CW (1995). Inhibitory effect of indomethacin on prostacyclin receptor-mediated cerebral vascular responses. *Am J Physiol* **268**: H1884–1890.
- 181 Pecq JB Le, Paoletti C (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem* **17**: 100–107.
- 182 Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, *et al* (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4857–4861.
- 183 Persson P-E, Nilsson OS, Berggren A-M (2005). Do non-steroidal anti-inflammatory drugs cause endoprosthetic loosening? A 10-year follow-up of a randomized trial on ibuprofen for prevention of heterotopic ossification after hip arthroplasty. *Acta Orthop* **76**: 735–740.
- 184 Pfitzer G (2001). Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* **91**: 497–503.
- 185 Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW (2005). cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**: L103–115.
- 186 Pierce Thermo Fisher Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit. .
- 187 Pierzchalski A, Mittag A, Tárnok A (2011). Introduction A: recent advances in cytometry instrumentation, probes, and methods--review. *Methods Cell Biol* **102**: 1–21.
- 188 Pittenger DE (1991). Heterotopic ossification. *Orthop Rev* **20**: 33–39.
- 189 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:

143–147.

190 Promega Corp. (2012). CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Instructions for use of product G1780. .

191 Quidville V, Segond N, Lausson S, Frenkian M, Cohen R, Jullienne A (2006). 15-Hydroxyprostaglandin-dehydrogenase is involved in anti-proliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs COX-1 inhibitors on a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **81**: 14–30.

192 Radcliff G, Jaroszeski MJ (1998). Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* **91**: 1–24.

193 Radtke S (2014). Entwicklung eines in vitro Nachweisverfahrens zur Analyse des Entwicklungspotentials humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. .

194 Rainsford KD (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* **42**: 3–27.

195 Raisz LG, Fall PM (1990). Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* **126**: 1654–1659.

196 Rapuano BE, Boursiquot R, Tomin E, Macdonald DE, Maddula S, Raghavan D, *et al* (2008). The effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on prostaglandin synthesis and the formation of heterotopic bone in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* **128**: 333–344.

197 Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I (1994). Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* **161**: 218–228.

198 Ritter MA, Vaughan RB (1977). Ectopic ossification after total hip arthroplasty. Predisposing factors, frequency, and effect on results. *J Bone Joint Surg Am* **59**: 345–351.

199 Robin JC, Brown MJ, Weinfeld N, Dziak R (1982). Prostacyclin: effects on cyclic AMP in bone cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **35**: 43–49.

200 Roche S, Delorme B, Oostendorp RAJ, Barbet R, Caton D, Noel D, *et al* (2009). Comparative proteomic analysis of human mesenchymal and embryonic stem cells: towards the definition of a mesenchymal stem cell proteomic signature. *Proteomics* **9**: 223–232.

201 Rodan GA, Noda M (1991). Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1**: 85–98.

- 202 Rosen ED, Spiegelman BM (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 145–171.
- 203 Ryoo H-M, Lee M-H, Kim Y-J (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* **366**: 51–57.
- 204 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- 205 Sakuma Y, Li Z, Pilbeam CC, Alander CB, Chikazu D, Kawaguchi H, *et al* (2004). Stimulation of cAMP production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E(2) and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. *Bone* **34**: 827–834.
- 206 Salie R, Kneissel M, Vukevic M, Zamurovic N, Kramer I, Evans G, *et al* (2010). Ubiquitous overexpression of Hey1 transcription factor leads to osteopenia and chondrocyte hypertrophy in bone. *Bone* **46**: 680–694.
- 207 Salisbury E, Sonnet C, Heggeness M, Davis AR, Olmsted-Davis E (2010). Heterotopic ossification has some nerve. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **20**: 313–324.
- 208 Sarrazin P, Bkaily G, Haché R, Patry C, Dumais R, Rocha FA, *et al* (2001). Characterization of the prostaglandin receptors in human osteoblasts in culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **64**: 203–210.
- 209 Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, *et al* (2004). Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* **94**: 1101–1108.
- 210 Schmidt T (2009). Infusion, Hüftkopfanbohrung oder Infusion nach Hüftkopfanbohrung in der Behandlung der atraumatischen Hüftkopfnekrose und des Knochenmarködemsyndroms. .
- 211 Schünke, Michael (Thieme: Kiel, 2000). *Funktionelle Anatomie - Topografie und Funktion des Bewegungssystems*. .
- 212 Scott A, Wong S, Ang K (1987). The relative effects of indomethacin, diphosphonates and low dose radiation for the prevention of heterotopic ossification. *Presented at the 33rd annual meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, CA, January 1987* .
- 213 Scott CEH, Streit J, Biant LC, Breusch SJ (2012). Periarticular infiltration in total hip

replacement: effect on heterotopic ossification, analgesic requirements and outcome. *Arch Orthop Trauma Surg* **132**: 703–709.

214 Sen B, Xie Z, Case N, Ma M, Rubin C, Rubin J (2008). Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology* **149**: 6065–6075.

215 Sharff KA, Song W-X, Luo X, Tang N, Luo J, Chen J, *et al* (2009). Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Biol Chem* **284**: 649–659.

216 Sigma-Aldrich Enzymatic Assay of Alkaline Phosphatase, Diethanolamine Assay (EC 3. 1. 3. 1) | Sigma-Aldrich. at <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-alkaline-phosphatase-diethanolamine-assay.html>>.

217 Sigma-Aldrich Sample Purification and Quality Assessment A Technical Guide to PCR Technologies. at <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sample-purification-and-quality-assessment.html>>.

218 Silva Meirelles L da, Caplan AI, Nardi NB (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**: 2287–2299.

219 Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**: 387–437.

220 Sonomoto K, Yamaoka K, Tanaka Y (2014). [An approach to bone and cartilage repair of rheumatoid arthritis by mesenchymal stem cells]. *J UOEH* **36**: 141–146.

221 Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* **129**: 163–173.

222 Stover SL, Niemann KM, Tulloss JR (1991). Experience with surgical resection of heterotopic bone in spinal cord injury patients. *Clin Orthop Relat Res* 71–77.

223 Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, *et al* (2001). Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* **108**: 241–250.

224 Styner M, Sen B, Xie Z, Case N, Rubin J (2010). Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. *J Cell Biochem* **111**: 1042–1050.

- 225 Subbarao JV, Garrison SJ (1999). Heterotopic ossification: diagnosis and management, current concepts and controversies. *J Spinal Cord Med* **22**: 273–283.
- 226 Suda M, Tanaka K, Yasoda A, Natsui K, Sakuma Y, Tanaka I, *et al* (1998). Prostaglandin E2 (PGE2) autoamplifies its production through EP1 subtype of PGE receptor in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Calcif Tissue Int* **62**: 327–331.
- 227 Summers WC (1970). A simple method for extraction of RNA from E. coli utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal Biochem* **33**: 459–463.
- 228 Susperregui ARG, Gamell C, Rodríguez-Carballo E, Ortuño MJ, Bartrons R, Rosa JL, *et al* (2011). Noncanonical BMP signaling regulates cyclooxygenase-2 transcription. *Mol Endocrinol* **25**: 1006–1017.
- 229 Takada I, Kouzmenko AP, Kato S (2009). Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* **5**: 442–447.
- 230 Takarada T, Hinoi E, Nakazato R, Ochi H, Xu C, Tsuchikane A, *et al* (2013). An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice. *J Bone Miner Res* **28**: 2064–2069.
- 231 Taşlı PN, Aydın S, Yalvaç ME, Sahin F (2014). Bmp 2 and bmp 7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells. *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 3016–3025.
- 232 Teich N, Rosendahl J, Tóth M, Mössner J, Sahin-Tóth M (2006). Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis. *Hum Mutat* **27**: 721–730.
- 233 Telesnitsky A, Goff SP (1997). Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. *Retroviruses* at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19383/>>.
- 234 Temin HM, Mizutani S (1992). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970. *Biotechnology* **24**: 51–56.
- 235 Teng X, Zhang Z, He G, Yang L, Li F (2012). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects. *J Insect Sci* **12**: 60.
- 236 Tillmann F-P, Jäger M, Blondin D, Schooldermann D, Voiculescu A, Sucker C, *et al* (2007). Intravenous iloprost: a new therapeutic option for patients with post-transplant distal limb syndrome (PTDLS). *Am J Transplant* **7**: 667–671.
- 237 Törnkvist H, Bauer FC, Nilsson OS (1985). Influence of indomethacin on experimental bone metabolism in rats. *Clin Orthop Relat Res* 264–270.

- 238 Traganos F (1984). Flow cytometry: principles and applications. II. *Cancer Invest* **2**: 239–258.
- 239 Tripmacher R (2005). Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen. .
- 240 Tsailas PG, Babis GC, Nikolopoulos K, Soucacos PN, Korres DS (2009). The effectiveness of two COX-2 inhibitors in the prophylaxis against heterotopic new bone formation: an experimental study in rabbits. *J Surg Res* **151**: 108–114.
- 241 Tseng W-P, Yang S-N, Lai C-H, Tang C-H (2010). Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. *J Cell Physiol* **223**: 810–818.
- 242 Tuteja N (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav* **4**: 942–947.
- 243 Ueno K, Haba T, Woodbury D, Price P, Anderson R, Jee WS (1985). The effects of prostaglandin E2 in rapidly growing rats: depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass. *Bone* **6**: 79–86.
- 244 Verrando P, Négrel R, Grimaldi P, Murphy M, Ailhaud G (1981). Differentiation of ob 17 preadipocytes to adipocytes. Triggering effects of clofenapate and indomethacin. *Biochim Biophys Acta* **663**: 255–265.
- 245 Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring H-J (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* **88**: 126–133.
- 246 Wada S, Kamiya S (2006). [Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Osteocalcin (OC)]. *Clin Calcium* **16**: 1017–1021.
- 247 Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A, *et al* (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE* **4**: e5846.
- 248 Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* **40**: 74–83.
- 249 Wang J, Wang Y, Wang S, Cai J, Shi J, Sui X, *et al* (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of

colorectal cancer. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.5739.

250 Wang Y, Bronshtein T, Sarig U, Nguyen EB-V, Boey FYC, Venkatraman SS, *et al* (2013). A mathematical model predicting the coculture dynamics of endothelial and mesenchymal stem cells for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* **19**: 1155–1164.

251 Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**: 269–282.

252 Watanabe T, Yatomi Y, Sunaga S, Miki I, Ishii A, Nakao A, *et al* (1991). Characterization of prostaglandin and thromboxane receptors expressed on a megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01s. *Blood* **78**: 2328–2336.

253 Wegmeyer H, Bröske A-M, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, *et al* (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev* **22**: 2606–2618.

254 Whittle BJ, Silverstein AM, Mottola DM, Clapp LH (2012). Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: treprostinil is a potent DP1 and EP2 agonist. *Biochem Pharmacol* **84**: 68–75.

255 Williams IH, Polakis SE (1977). Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. The effect of indomethacin, prostaglandin E1 and cyclic AMP on the process of differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **77**: 175–186.

256 Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y (2013). The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev* **65**: 1010–1052.

257 Yoon DS, Yoo JH, Kim YH, Paik S, Han CD, Lee JW (2010). The effects of COX-2 inhibitor during osteogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **19**: 1523–1533.

258 Zaidi M (1990). Modularity of osteoclast behaviour and “mode-specific” inhibition of osteoclast function. *Biosci Rep* **10**: 547–556.

259 Zhang W, Yang N, Shi X-M (2008a). Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem* **283**: 4723–4729.

260 Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O’Keefe RJ (2002). Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* **109**: 1405–1415.

261 Zhang X-W, Zhang B-Y, Wang S-W, Gong D-J, Han L, Xu Z-Y, *et al* (2014). Twist-

related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2. *J Thorac Cardiovasc Surg* doi:10.1016/j.jtcvs.2014.02.084.

262 Zhang Y, Hassan MQ, Li Z-Y, Stein JL, Lian JB, Wijnen AJ van, *et al* (2008b). Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **105**: 487–496.

263 Zhu F, Sweetwyne MT, Hankenson KD (2013). PKC δ is required for Jagged-1 induction of human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Stem Cells* **31**: 1181–1192.

264 Zilkens C, Lögters T, Bittersohl B, Krauspe R, Lensing-Höhn S, Jäger M (2010). Spinning around or stagnation - what do osteoblasts and chondroblasts really like? *Eur J Med Res* **15**: 35–43.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| AAD | 7-Aminoactinomycin |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | <i>Avidin-Biotin-Complex</i> |
| ACAD | <i>Acid Citrat Dextrose Antikoagulans</i> |
| ACE | Angiotensine Converting Enzyme |
| ALP | Alkalische Phosphatase |
| ANOVA | <i>Analysis of variances</i> |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | aktiviertes Protein C |
| <i>aqua dest.</i> | <i>aqua destillata</i> |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchonic acid |
| b-FGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| BMP | <i>Bone Morphogenetic Protein</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| bzw. | Beziehungsweise |
| Ca ⁺⁺ | Kalziumion |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CXCL2, | <i>chemokine C-X-C motif ligand 2</i> |
| CXCL3 | und 3 |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| Cm | Zentimeter |
| Col1 | Collagen Typ 1 |
| COX | Cyclooxygenase |
| CRP | C Reaktives Protein |
| D | Tag |
| D | Deutschland |
| DAG | Dexamethason-Ascorbinsäure-β-Glycerolphosphat |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DANN | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>Eppendorf-cup</i> | Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| etc. | <i>et cetera</i> |
| Fa. | Firma |
| FACS | <i>Fluorecence activated cell sorting</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FS | <i>foreward scatter</i> |
| FZD | <i>Frizzled Receptor</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat- |

| | |
|-----------------|--|
| | Dehydrogenase |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | <i>Green fluorescence protein</i> |
| G-Protein | Guaninnucleotid bindendes Protein |
| griech. | Griechisch |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H | Stunde |
| HGF | <i>hepatocyte growth factor</i> |
| HLH | Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor |
| HO | Heterotope Ossifikation |
| HRP | <i>Horseradish-peroxidase</i> |
| HSCs | Hämatopoetisch Stammzelle |
| HWZ | Halbwertszeit |
| i.E. | Internationale Einheiten |
| i.v. | Intravenös |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF | <i>Insuline like groth factor</i> |
| IL-1ra | Interleukin 1 Rezeptorantagonist |
| IL 8 | Interleukin 8 |
| Ilo | Iloprost |
| IMDM | <i>Iscoe's modified Dulbecco's medium</i> |
| In | Indomethacin |
| Indo | Indomethacin |
| IP ₃ | Inositol-Triphosphat |
| ITZ | Institut für Transplantationsdiagnostik |
| J | Japan |
| K | Kontrolle |
| Kap. | Kapitel |
| KM | Knochenmark |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LPR | <i>Lipoprotein-like Receptor</i> |
| LSM | Lymphozytenseparationsmedium |
| LT | Leukotrien |
| LVEF | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion |
| NGR1 | <i>negativ growth regulator protein 1</i> |
| M | Männlich |
| M | Molar |
| MAML | <i>mastermind-like</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MCP-1 | <i>monocyte chemotactic protein 1</i> |
| M-CSF | <i>Macrophage-colony stimulation factor</i> |
| Min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mRNA | Mitochondriale Ribonukleinsäure |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MSCs | Mesenchymale Stammzellen |
| Ng | Nanogramm |
| Nm | Nanometer |
| NSAIDs | <i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> |
| NSAR | Nicht-steroidale Antirheumatika |

| | |
|-------------------|---|
| NYHA | <i>New York Heart Association</i> |
| OC | Osteocalcin |
| OI | Osteogenesis imperfecta |
| OP | Osteopontin |
| pAVK | periphere Arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | <i>Phosphate buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PG | Prostaglandin |
| PGI ₂ | Prostazyklin |
| PKA | Proteinkinase A |
| PMT | <i>Photomultiplier tube</i> |
| pNPP | p-Nitrophenylphosphat |
| PPAR _γ | <i>peroxysome proliferator-activated receptor gamma</i> |
| PP | Pyrophosphat |
| PSG | Penicillin/Streptomycin/Gentamycin |
| PTH | Parathormon |
| RANKL | <i>Receptor Activator of NF-κB</i> |
| RLT | <i>RNeasy lysis puffer</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RR | Nicht-invasive Blutdruckmessung nach Riva Rocchi |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RT | Raumtemperatur |
| Runx | <i>Runt-related transcription factor</i> |
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| SCL | Sclerostin |
| SDF-1a | <i>stromal cell derived factor 1a</i> |
| Sec | Sekunde(n) |
| SPSS | Statistical Package for the Social Science |
| sog. | sogenannt(e) |
| SS | <i>side scatter</i> |
| STABW | Standardabweichung |
| Tab. | Tabelle |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| TGF | <i>Tissue growth factor</i> |
| TNFAIP6 | <i>tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i> |
| TRI | <i>Total RNA isolation</i> |
| TXA ₂ | Thromboxan A ₂ |
| u.a. | Unter anderem |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| VAS | Visuelle Analogskala |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| W | Weiblich |
| Wnt | Kombination aus <i>Wingless</i> und Int-1 |
| z.B. | zum Beispiel |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des BMP/Smad- und Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges. Scl: Sclerostin, PTH: Parathormon, BMP: bone morphogenetic protein, FZD: frizzled receptor, LPR: lipoprotein-like receptor (modifiziert nach ten Dijke et al, 2008)..... | 14 |
| Abbildung 2: Wirkungen durch nicht-selektive (NSAIDs) und selektive (COXibe) Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren. NSAIDs inhibieren COX1 und 2, COXibe die COX2; dadurch wird die Katalyse von Arachidonsäure zum jeweiligen Produkt gehemmt (\downarrow) oder begünstigt (\uparrow). Die therapeutisch gewünschten Wirkungen sind rot hervorgehoben. NSAIDs = non steroidal anti-rheumatic drugs; PGE ₂ = Prostaglandin E ₂ ; PGI ₂ = Prostaglandin I ₂ (Prostazyklin); PGH ₂ = Prostaglandin H ₂ ; TXA ₂ = Thromboxan A ₂ ; MI = Myokardinfarkt (Eigene Darstellung, abgeleitet aus Bertolini et al, 2001; Rainsford, 2007; Simmons et al, 2004)..... | 19 |
| Abbildung 3: Überblick über den Versuchsaufbau mit Angabe der durchgeführten Versuche an den Kinetikpunkten 1 (Tag 10) und 2 (Tag 28). | 24 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung von Knochenmarkaspirat auf Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077 vor und nach Dichtegradientenzentrifugation. MNCs = mononucleäre Zellen (eigene Darstellung nach Radtke, 2014; Tripmacher, 2005)..... | 26 |
| Abbildung 5: Lichtmikroskopische Kontrolle (100-fache Vergrößerung) nach 7 Tagen (links) und 12 Tagen (rechts) Anzucht der MNCs von Spender B ohne Zusatz von Indomethacin oder Iloprost. Erkennbar sind die zunehmenden fibroblastenartigen Zellausläufer, was lichtmikroskopisch auf MSCs hindeutet. | 27 |
| Abbildung 6: Konzentration von intrazellulärem cAMP in Abhängigkeit von der molaren Iloprost-Konzentration (modifiziert nach Fetalvero et al. 2005). | 31 |
| Abbildung 7: Durchflusszytometrische Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark von Spender A nach Isolation und Expansion. SSC = sideward scatter, FSC = forward scatter, CD = cluster of differentiation, 7-AAD = 7-Aminactinomycin, IgG1 = Immunglobulin G1, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin. | 43 |
| Abbildung 8: Absolute Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkulturen Spender A, B und H im zeitlichen Verlauf. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 44 |
| Abbildung 9: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0), alleinige Zugabe von Iloprost (0+Ilo) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Iloprost (Ilo). * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 46 |
| Abbildung 10: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Iloprost. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). Im Versuchsansatz mit 10^{-6} M Indomethacin der MSCs von Spender B stellte sich nachträglich ein Fehler in der Konzentrationsberechnung heraus, sodass dieser Versuchsansatz nicht ausgewertet werden konnte. | 48 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 11: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Versuchstag 10 und 28 ohne Zusätze (0) sowie unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit Iloprost (Ilo). * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 50 |
| Abbildung 12: Darstellung der errechneten absoluten Zellzahl der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte der beiden Konzentrationen). Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 52 |
| Abbildung 13: Grafische und tabellarische Darstellung der absoluten Zellzahlen der Spender E, F und G an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M (Spender E), und 10^{-6} M (Spender F) und 0+Ilo (Spender G). MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 53 |
| Abbildung 14: Immunzytochemische Untersuchung der Expression von CD34, CD45, CD105, Col1, OC, Runx2, Twist und ALP in MSCs aus dem Knochenmark von Spender A an Tag 10 und 28 ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost. Die Expression der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 konnte nicht nachgewiesen werden (-), wohingegen der mesenchymale Marker CD105 stark exprimiert wurde (+++). 400-fache Vergrößerung | 55 |
| Abbildung 15: Expression von Runx2, OC und ALP mit steigender Indomethacin-Konzentration in MSCs von Spender A (10^{-6} M und 10^{-4} M) und B (10^{-5} M) an Tag 10. 400-fache Vergrößerung. | 57 |
| Abbildung 16: Expression von Runx2, OC und ALP mit steigender Indomethacin-Konzentration unter Zugabe von Iloprost in MSCs von Spender A an Tag 10. 400-fache Vergrößerung. | 58 |
| Abbildung 17: Expression von Twist der Versuchsansätze Kontrolle 0 (Spender C, links), 0+Ilo (Spender H, Mitte) und 10^{-6} M+Ilo (Spender C, rechts) an Tag 10. 400-fache Vergrößerung. | 58 |
| Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für GAPDH und ALP (hier AP). L = DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K = Kontrolle aus aqua bidestillata, 500 = 500 Basenpaare..... | 61 |
| Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für CD34 und CD45. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus aqua bidestillata, 500 = 500 Basenpaare..... | 61 |
| Abbildung 20: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für CD105 und OC. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus aqua bidestillata, 500 = 500 Basenpaare..... | 62 |
| Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR mit den Primern für Runx2 und Col1. L=DNA-Leiter (Molekülmassenstandards), K=Kontrolle aus aqua bidestillata, 500 = 500 Basenpaare..... | 62 |
| Abbildung 22: Proteinkonzentration der MSCs von Spender A, B und H im zeitlichen Verlauf. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 64 |
| Abbildung 23: Proteinkonzentration von Spender A (oben) und B (unten) an den Versuchstagen 10 und 28 unter Zugabe unterschiedlicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne 10^{-7} M Iloprost. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 65 |
| Abbildung 24: Spezifische ALP-Aktivität der Zellreihen Spender A, B und H ohne Zugabe von Indomethacin oder Iloprost im Verlauf des Versuchs. | 66 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 68 |
| Abbildung 26: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 70 |
| Abbildung 27: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte mit der Kontrolle (0)). Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 72 |
| Abbildung 28: Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Tag 10 und 28. * = $p < 0,05$ (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28 im Vergleich der Mittelwerte der beiden Konzentrationen. Positive vertikale Fehlerindikatoren (Standardabweichung). | 74 |
| Abbildung 29: Grafische und tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität der Spender E, F und G an Versuchstag 10 und 28 mit den Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M (spender E), und 10^{-6} M (Spender F) und 0+Ilo (Spender G). MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. Vertikale positive Fehlerindikatoren (Standardabweichung)..... | 75 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>Tabelle 1: Alter und Geschlecht der Knochenmarkspender und Anzahl der durchgeführten Passagen der gewonnenen Knochenmarkprogenitorzellen.</i> | 25 |
| <i>Tabelle 2: Zuordnung von Indomethacin-Konzentration und Iloprost-Zugabe (10^{-7} M) zur in dieser Konzentration kultivierten Zellreihe des Spenders. *Im Versuchsansatz mit 10^{-6} M Indomethacin der MSCs von Spender B stellte sich nachträglich ein Fehler in der Konzentrationsberechnung heraus, so dass dieser Versuchsansatz nicht ausgewertet werden konnte.....</i> | 23 |
| <i>Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums.....</i> | 30 |
| <i>Tabelle 4: Klon, Spezies, Hersteller und Arbeitsverdünnung der Primärantikörper.</i> | 37 |
| <i>Tabelle 5: Mastermix (aus One-Step-RT-PCR Kit®, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 4 Versuchsansätze für die 8 zu untersuchenden Marker alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), Runt-related transcription factor 2 (Runx2). Cluster of differentiation 34 (CD34), CD45, CD105, und Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH).</i> | 39 |
| <i>Tabelle 6: Auflistung der für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Primer für die Marker alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen 1 (Col1), Osteocalcin (OC), Runt-related transcription factor 2 (Runx2). Cluster of differentiation 34 (CD34), CD45, CD105, und glycerinaldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Herstellerangaben im Anhang ersichtlich.</i> | 41 |
| <i>Tabelle 7: Gemittelte Zellzahlen der Versuchsansätze der Spender A-G an Tag 10 und 28. Die Ergebnisse des Versuchsansatzes Spender B mit 10^{-4} M Indomethacin flossen bei extrem stark abweichenden Zellzahlen nicht in die Auswertung mit ein.</i> | 45 |
| <i>Tabelle 8: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle 0, im Vergleich der Kontrolle 0 mit und ohne Zugabe von Iloprost (0+Ilo), sowie im Vergleich gleicher Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost. Spender A.</i> | 46 |
| <i>Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender A an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.</i> | 47 |
| <i>Tabelle 10: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle 0, sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender B.</i> | 48 |
| <i>Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender B an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.</i> | 49 |
| <i>Tabelle 12: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost mit der Kontrolle 0. Spender C.</i> | 50 |
| <i>Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender C an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung.</i> | 51 |
| <i>Tabelle 14: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der absoluten Zellzahlen der Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-4} M. Spender D.....</i> | 52 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der errechneten Zellzahl in den Versuchsansätzen von Spender D an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. | 52 |
| Tabelle 16: Semiquantitative Auswertung der immunzytochemischen Analyse aller Versuchsansätze bezüglich des Anteils gefärbter Zielstrukturen: - = Fehlen einer immunzytochemischen Färbung, + = weniger als 50%, ++ = 50-75% und +++ = >75% angefärbte Zielstrukturen. Die rot hinterlegten Felder weisen auf die Suppression von Twist unter Kombination von Indomethacin und Iloprost hin. | 56 |
| Tabelle 17: Semiquantitative Unterteilung der Expression der untersuchten Marker anhand der Bandenintensität in der Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR. | 59 |
| Tabelle 18: Größe der verwendeten Primer in Basenpaaren (bp). GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (housekeeping gene), ALP = Alkalische Phosphatase, CD = (cluster of differentiation), OC = Osteocalcin, Runx2 = Runt related transcription factor 2, Col1 = Kollagen 1. | 60 |
| Tabelle 19: RNA-Nummern und zugehöriger Versuchsansatz zur Agarosegelelektrophorese der RT-PCR in den Abbildungen 28-31. | 60 |
| Tabelle 20: Gemittelte spezifische ALP-Aktivität in $\mu\text{Units}/\mu\text{g} \cdot \text{hour}$ der Versuchsansätze der Spender A-G an Tag 10 und 28. | 64 |
| Tabelle 21: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle 0 sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender A. | 68 |
| Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender A an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. | 69 |
| Tabelle 23: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit der Kontrolle 0 sowie im Vergleich identischer Indomethacin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Iloprost (Ilo). Spender B. | 70 |
| Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender B an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. | 71 |
| Tabelle 25: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität verschiedener Indomethacin-Konzentrationen mit Zugabe von Iloprost (Ilo) mit der Kontrolle 0. Spender C. | 72 |
| Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender C an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung. | 73 |
| Tabelle 27: Statistische Signifikanzen (p-Werte ermittelt im abhängigen t-Test für Tag 10 und 28) im Vergleich der spezifischen ALP-Aktivität der Indomethacin-Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M mit der Kontrolle 0. Spender D. | 74 |

Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der spezifischen ALP-Aktivität pro μg Protein pro Stunde der Versuchsansätze der Zellkultur Spender D an Tag 10 und 28. MW = Mittelwert, STABW =

Standardabweichung. 74

8.3 Chemikalien

| | |
|---|--------------------------|
| 30% H ₂ O ₂ | (VWR, Darmstadt D) |
| ABC (Avidin-Biotin-Complex) | (Biozol, Eching D) |
| ACDA (<i>Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A</i>) | (Harvest, München D) |
| Alkalische Phosphatase <i>Vector blue</i> <i>aqua dest.</i> | (Vector, Burlingame USA) |
| DAB (3,3 Diaminobenzidin) | (Sigma, Taufkirchen D) |
| DMEM <i>Low Glucose (Dulbecos Minimal Essential Medium)</i> | (PAA, Cölbe D) |
| Ethanol für die Molekularbiologie | (VWR, Darmstadt D) |
| FCS Gold EU-Standard (<i>fetal calf serum</i>) | (PAA, Cölbe D) |
| Glycerin-Gelatine | (Merck, Darmstadt D) |
| Haemalaun nach Mayer | (VWR, Darmstadt D) |
| Heparin | (Ratiopharm, Ulm D) |
| Ilomedin | (Bayer, Leverkusen D) |
| Indomethacin 25mg Hartkapseln | (Ratiopharm, Ulm, D) |
| Isoton® II-Puffer | (Coulter, Krefeld, D) |
| Lymphozytenseparationsmedium (LSM) | (PAA, Cölbe D) |
| Mercaptoethanol für die Molekularbiologie | (VWR, Darmstadt D) |
| <i>OneStep</i> RT-PCR Kit (Cat. No. 210212) | (Qiagen, Hilden D) |
| P/S/G (L-Glutamine 200 mM mit Penicillin und Streptomycin) | (PAA, Cölbe D) |
| PBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</i>) | (PAA, Cölbe D) |
| Qiashredder <i>Homogenizers</i> | (Qiagen, Hilden D) |
| <i>RNase-free DNase-Set</i> | (Qiagen, Hilden D) |
| RNeasy <i>Mini-Kit</i> | (Qiagen, Hilden D) |
| Roti®-Histofix 4% säurefrei | (Roth, Karlsruhe D) |
| TRI® <i>Reagent</i> | (Sigma, Steinheim, D) |
| Triton X100 | (VWR, Darmstadt D) |
| Trypsin-EDTA | (PAA, Cölbe D) |

8.3.1 Verwendete Primer

| | |
|--|-------------------------------|
| Alkalische Phosphatase (ALP) | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| Kollagen 1 (Col1) | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| Osteocalcin (OC) | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| <i>Runt-related transcription factor 2</i> (Runx2) | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| CD (<i>cluster of differentiation</i>) 34 | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| CD 45 | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| CD 105 | Thermo Fisher Scientific, Ulm |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) | Thermo Fisher Scientific, Ulm |

8.3.2 Assay-Kits

| | |
|--|--|
| ALP-Assay | (Sigma, Steinheim D) |
| BCA-Assay | (Greiner, Flacht D) |
| CytoTox96® <i>Non-Radioactive Cytotoxicity Assay</i> | (Promega, Madison USA) |
| Calcium CPC FS-Kit | (Greiner Biochemica, DiaSys Diagnostics Systems) |

8.4 Biochemikalien:

8.4.1 Immunzytochemische Marker

| | |
|-------------|----------------------------|
| Osteocalcin | (Santa Cruz, Heidelberg D) |
| Collagen 1 | (Cosmo Bio, Tokyo J) |
| CD34 | (DAKO, Hamburg D) |
| CD 45 | (DAKO, Hamburg D) |
| CD 105 | (DAKO, Hamburg D) |
| Runx2 | (R&D, Wiesbaden D) |
| Twist | (Santa Cruz, Heidelberg D) |

8.4.2 Antikörper

| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Ziege-anti-Maus-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |
| Ziege-anti-Kaninchen-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |
| Kaninchen-anti-Ziege-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |
| Ziege-anti-Ratte-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |

8.4.3 Enzyme:

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| LDH (Laktatdehydrogenase) | (Sigma, Steinheim D) |
| AP (Alkalische Phosphatase) | (Roche, Mannheim D) |

8.5 Verbrauchsmittel und Geräte

| | |
|---|--------------------------|
| 12- <i>well</i> -Platten | (NUNC, Wiesbaden D) |
| 24- <i>well</i> -Platten | (NUNC, Wiesbaden D) |
| Eppendorf Thermomixer® comfort | (Eppendorf, Hamburg, D) |
| Falcon-Röhrchen | (VWR, Darmstadt, D) |
| T25-Kulturflaschen | (NUNC, Wiesbaden D) |
| T75 Kulturflaschen | (NUNC, Wiesbaden D) |
| T175-Kulturflaschen | (NUNC, Wiesbaden D) |
| Brutschrank | (Binder, Tuttlingen D) |
| Mastercycler® Pro PCR | (Eppendorf, Hamburg, D) |
| Neubauer Zählkammer | (VWR, Darmstadt D) |
| Zentrifuge Eppendorf 5810 R | (Eppendorf, Hamburg D) |
| Spektralphotometer Cary 50 Bio | (Varian, Darmstadt D) |
| Cytomics FC500 <i>Flow Cytometrie Systems</i> | (Beckman, Brea USA) |
| Zeiss <i>Axio Vision</i> | (Zeiss, Oberkochen, D) |
| Zeiss Mikroskop | (Zeiss, Oberkochen, D) |

8.6 **Verwendete Computerprogramme**

| | |
|--------------------------------|---------------------------|
| Microsoft Office 2007 und 2010 | (Microsoft, Redmond, USA) |
| ChemSketch 12.01 | (ACD, Toronto, Canada) |
| SPSS 17.0 und 21.0 | (IBM, Armonk, USA) |

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Jäger, der diese Arbeit konzipiert hat und mich als Ansprechpartner bei Fragen oder Organisatorischem stets unterstützt hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Monika Herten und Sabine Lensing-Höhn bedanken, die mir im Labor stets zur Seite standen, mich in die Labortätigkeiten eingearbeitet haben und mir immer mit gutem Rat beiseite standen. Herrn PD Dr. Johannes Fischer vom ITZ danke ich für die Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Analysen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Astrid und Peter Kemper sowie meinen Schwestern Hannah und Esther, die mir das Medizinstudium erst ermöglichten, mich immer motiviert und in allem unterstütz haben.

Außerdem möchte ich Philipp Sewerin und Antonius Antoniadis für die gute Zusammenarbeit im Labor danken sowie Dr. rer. nat. Martin Ostapczuk für die Hilfe und Erklärungen bei den statistischen Auswertungen und meinen Freunden Thomas, Nils, Tim, Christoph und Eva.

Zudem möchte ich mich bei Esther Kemper, Karina Lloyd, Marlis Torka und Agnes Gorecki für ihre Tipps und das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.